



**UNIVERSIDAD DE LEÓN**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

**“PRINCIPALES RIESGOS MICROBIOLÓGICOS  
DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS CRUDO-CURADOS  
ENVASADOS EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS Y/O VACÍO  
DE INTERÉS ECONÓMICO EN CASTILLA Y LEÓN”**

**Rosa Ana Menéndez García**

**León, Junio 2012**





## **UNIVERSIDAD DE LEÓN**

Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos

**“PRINCIPALES RIESGOS MICROBIOLÓGICOS  
DE LOS PRODUCTOS CÁRNICOS CRUDO-CURADOS,  
ENVASADOS EN ATMÓSFERAS MODIFICADAS Y/O VACÍO,  
DE INTERÉS ECONÓMICO EN CASTILLA Y LEÓN”**

Memoria que presenta  
Rosa Ana Menéndez García,  
Licenciada en Veterinaria  
y Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos,  
para optar al grado de Doctora por la Universidad de León



Para llevar a cabo la presente Tesis Doctoral la autora fue beneficiaria de una Beca de Investigación de la Universidad de León desde julio de 2007 a diciembre de 2011.

El trabajo recogido en la presente Memoria ha sido subvencionado por la Consejería de Sanidad de la Junta de Castilla y León a través del Convenio de Colaboración entre la misma y el Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos de León suscrito el 25 de abril de 2007.



Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a los "reactivos" de mi particular reacción de PCR

A los cebadores, a los que inician:

A la Dra. M<sup>a</sup> del Camino García, a la persona y a la profesional, por darme una oportunidad, porque su confianza y su apoyo me han permitido desarrollarme como investigadora pudiendo cuidar de mi familia. Porque me has hecho sentir más fuerte y más útil. Gracias, de verdad.

A Dr. Javier Sanz, el otro gran artífice y responsable de este trabajo de investigación. Te agradezco las numerosas horas y el esfuerzo que has dedicado a esta Tesis y a la formación de la doctoranda. ¡Gracias!

A la polimerasa, a la que sintetiza:

Al Dr. Jesús Santos, al que le tengo mucho que agradecer por su gran eficiencia, amabilidad y buena disposición en la formación de la doctoranda en la técnica de PCR.

Al Magnesio, al que mejora el rendimiento:

Al Dr, Miguel Prieto, que con gran cordialidad y un trato afable ha colaborado, y educado a la doctoranda, en la parte estadística de este trabajo.

A los nucleótidos, a los que construyen:

A Eugenia Rendueles, que me ha acompañado en lo personal y en lo profesional durante todo estos largos años. Gracias por tu ayuda, tus horas y tu hombro ;)

A Tiquio Campos, porque, por mucho que gruña, siempre colabora, ayuda y alegría, contribuyendo a que las cosas sean más amables ;)

A Cristina Muñoz, por su alegría, por su generosidad con la información y, especialmente, por su amena compañía. Gracias, Cris!

A Domingo Fernández, por todos los "truquis" informáticos que taaanto me han facilitado la vida, y por los ratos de tan agradable conversación ;)

A otros adyuvantes, como el KCl o el Tris-HCl, que mejoran la reacción:

A l@s much@s becari@s que durante estos años han colaborado en este trabajo de investigación, que con su buena disposición y ganas de aprender han contribuido a adelantarlo, mejorarlo y a fijar conocimientos en la doctoranda. Muy especialmente en lo personal y en lo profesional a Eva, a Elba, a Jetzabel, a Coral, a Txoni y a Miriam.

Al Tritón X-100, que ayuda a mejorar el entorno de la reacción:

A Servi, M<sup>a</sup> José, M<sup>a</sup> Jesús y María, porque, además de que con su trabajo han contribuido a que el mío sea más fácil, también me han aportado excelentes horas de conversación y distensión ;)

Por último, al reactivo esencial, a aquel que crea el entorno único para que todo esto haya podido suceder, al agua de extraordinaria calidad PCR:

A mis amigas, a las que lo fueron, a las que lo son y a las que, espero, lo serán. A todas esas mujeres buenas que me han acompañado, me han hecho reír y llorar, me han aportado, me han hecho mejor y más plena. Especialmente a las que siempre han estado ahí, a mis amigas del alma, a Ceci, a Moni, a Eva y a mi tocaya Rosana ;)

A mi ancestros, a tod@s los hombres y mujeres trabajadores, cuyo esfuerzo, amor a la familia y generosidad han contribuido a mejorar la vida y las metas de sus descendientes, entre los que yo estoy.

Especialmente a mis abuel@s y a mi tía Rosi, que con su incondicional cariño, su sabiduría, su experiencia y su grandísima generosidad han hecho mi vida más fácil, más completa, y que me han hecho sentir tan especial.

A mis buenos suegros, Gonzalo y Amparo, que han colaborado plenamente en que este trabajo haya podido salir adelante cuidando y queriendo con locura a lo que más me importa, mi hijo, que me han dado un marido maravilloso, Gustavo, y que me han cuidado con buena comida durante tantos años ;)



A mis maravillosos padres, Luís e Isabel, cuyo amor incondicional, su inmensa y desinteresada generosidad, y su desprendida tolerancia al permitirme buscar mi propio camino, me han permitido llegar a ser quien soy en todos, todos los aspectos. Gracias, papá y mamá.

A Gustavo, a mi compañero de viaje, a la mejor persona que hay en mi vida. Gracias por todo, por darme un hijo maravilloso, por complementarme, por apoyarme siempre, por hacerme reír, por comprenderme, por tu inteligencia, tolerancia y generosidad, por aportarme tanto, ¡tanto! La vida contigo es maravillosa.

A ti, Martín, a lo esencial, a lo más extraordinario que me ha pasado en la vida, a la personita que ya eres :),,,

Román, te esperamos con muchísima ilusión y cariño ;D

Sinceramente agradecida y felizmente emocionada por tan grata, y estupenda, ampliación:

Rosana Menéndez, la muestra :)



A los que más quiero



# ÍNDICES



# ÍNDICE GENERAL

## INTRODUCCIÓN

1. El interés económico de los productos cárnicos crudo-curados y salazones cárnicas elaborados en Castilla y León.....3
2. Nuevos sistemas de envasado y distribución: el envasado en atmósferas modificadas.....11
3. Principales patógenos asociados al consumo de productos cárnicos crudo-curados y salazones cárnicas.....17
4. Nuevas técnicas de detección molecular de microorganismos: PCR.....22
5. Una herramienta para conocer la vida útil y los riesgos microbiológicos de los alimentos: *Challenge Test* .....39

## JUSTIFICACIÓN, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS.....47

## CAPÍTULO I: Evaluación de la calidad de productos cárnicos elaborados y comercializados en Castilla y León

- I.1. Introducción.....53
- I.2. Material y métodos
  - I.2.1. Descripción de las muestras.....60
  - I.2.2. Análisis físico-químico.....62
  - I.2.3. Análisis microbiológico.....64
  - I.2.4. Análisis estadístico.....65
- I.3. Resultados
  - I.3.1. Resultados de los análisis físico-químicos.....67
  - I.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos.....71
  - I.3.3. Observaciones sobre el etiquetado de los productos cárnicos.....77
- I.4. Discusión
  - I.4.1. Discusión de los resultados físico-químicos.....79
  - I.4.1. Discusión de los resultados microbiológicos.....94
    - I.4.2.1. Discusión de los resultados de los análisis microbiológicos en embutidos fermentados.....95

I.4.2.2. Discusión de los resultados de los análisis microbiológicos en salazones cárnicas.....	99
---	----

**CAPÍTULO II: Incidencia de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria en productos cárnicos elaborados y comercializados en Castilla y León**

II.1. Introducción.....	109
II.2. Material y métodos	
II.2.1. Descripción de las muestras.....	123
II.2.2. Aislamiento y detección.....	123
II.2.3. Caracterización.....	131
II.2.4. Identificación.....	132
II.2.5. Análisis estadístico.....	133
II.3. Resultados del aislamiento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella</i> spp. y <i>Clostridium botulinum</i> .....	133
II.4. Discusión	
II.4.1. Discusión de los resultados de la detección e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> en los productos cárnicos analizados.....	140
II.4.2. Discusión de los resultados de la detección e identificación de <i>Salmonella</i> spp. en los productos cárnicos analizados.....	144
II.4.3. Discusión de los resultados de la detección e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en los productos cárnicos analizados.....	146
II.4.4. Discusión de los resultados de la detección e identificación de <i>Clostridium botulinum</i> en los productos cárnicos analizados.....	152

**CAPÍTULO III: Evaluación de la supervivencia de *Staphylococcus aureus* inoculado en productos cárnicos loncheados y envasados en distintas atmósferas**

III.1. Introducción.....	157
III.2. Material y métodos	
III.2.1. Planificación del <i>Challenge Test</i> .....	162
III.2.2. Descripción de la muestras.....	164
III.2.3. Análisis físico-químico.....	164



III.2.4. Análisis microbiológico general.....	165
III.2.5. Cepa y preparación del inóculo.....	165
III.2.6. Preparación, inoculación y condiciones de almacenamiento de las muestras.....	166
III.2.7. Análisis microbiológico de las muestras inoculadas.....	167
III.3. Resultados	
III.3.1. Resultados de los análisis microbiológicos y físico-químicos previos de los productos a inocular.....	168
III.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero.....	169
III.3.3. Resultados de los análisis microbiológicos del producto en los distintos tiempos de muestreo.....	170
III.4. Discusión.....	177

**CAPÍTULO IV: Evaluación de la supervivencia de *Listeria monocytogenes* inoculada en productos cárnicos loncheados y envasados en diferentes atmósferas**

IV.1. Introducción.....	187
IV.2. Material y métodos	
IV.2.1. Planificación del <i>Challenge Test</i> .....	196
IV.2.2. Descripción de la muestras.....	197
IV.2.3. Cepa y preparación del inóculo.....	198
IV.2.4. Preparación, inoculación y condiciones de almacenamiento de las muestras.....	198
IV.2.5. Análisis microbiológico de las muestras inoculadas.....	200
IV.3. Resultados	
IV.3.1. Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero.....	201
IV.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos del producto inoculado en los tiempos de muestreo.....	202
IV.4. Discusión.....	209

**CAPÍTULO V: Evaluación de la supervivencia de *Clostridium sporogenes*, como apatógeno de *Clostridium botulinum*, inoculado en productos cárnicos loncheados y envasados en distintas atmósferas**

V.1. Introducción.....	221
V.2. Material y métodos	
V.2.1. Planificación del <i>Challenge Test</i>	
V.2.1.1. Planificación de las inoculaciones y análisis correspondientes.....	234
V.2.1.2. Planificación e implementación de la técnica de PCR....	236
V.2.2. Descripción de la muestras.....	237
V.2.3. Cepa y preparación del inóculo.....	239
V.2.4. Preparación, inoculación y condiciones de almacenamiento de las muestras.....	241
V.2.5. Análisis microbiológico de las muestras inoculadas.....	242
V.2.6. Técnica de PCR	
V.2.6.1. Determinación del límite de detección de la PCR.....	242
V.2.6.2. Detección por PCR en los productos inoculados.....	245
V.3. Resultados	
V.3.1. Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero.....	249
V.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos en los distintos tiempos de muestreo.....	250
V.3.3. Resultados de la técnica de PCR	
V.3.3.1. Resultados del límite de detección de la técnica.....	257
V.3.3.2. Resultados de la detección de <i>Clostridium sporogenes</i> sobre los productos inoculados.....	260
V.4. Discusión.....	264

**CAPÍTULO VI: Evaluación de la supervivencia de esporas *Clostridium sporogenes*, como apatógeno de *Clostridium botulinum*, durante el proceso de elaboración de cecina de vacuno**

VI.1. Introducción.....	277
VI.2. Material y métodos	
VI.2.1. Planificación del trabajo experimental.....	281

VI.2.2. Descripción de las muestras.....	282
VI.2.3. Análisis físico-químico.....	284
VI.2.4. Análisis microbiológico previo.....	284
VI.2.5. Cepa y preparación del inóculo.....	284
VI.2.6. Preparación, inoculación y condiciones de almacenamiento de las piezas cárnicas.....	285
VI.2.7. Análisis físico-químico y microbiológico de las muestras inoculadas.....	288
VI.2.8. Identificación por PCR.....	289
VI.3. Resultados	
V.3.1. Resultados de los análisis físico-químicos.....	289
V.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos previos.....	291
V.3.3. Resultados de los análisis microbiológicos en los distintos tiempos de muestreo.....	291
V.3.4. Incidencias.....	294
VI.4. Discusión.....	294
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>307</b>
<b>GLOSARIO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS.....</b>	<b>313</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>317</b>



# ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Características económicas de las industrias cárnicas de Castilla y León y de España (INE, 2007).

**Tabla 2.** IGP Y DOs de productos cárnicos de Castilla y León (MAPA, 2005).

**Tabla 3.** Principales bacterias patógenas aisladas en productos cárnicos.

**Tabla 4.** Inhibidores identificados de PCR.

**Tabla I.I.** Resumen de los productos cárnicos y de las distintas presentaciones comerciales objetos de estudio en los capítulos I y II.

**Tabla I.II.** Protocolos normalizados de los análisis físico-químicos, métodos y/o aparatos utilizados en el capítulo I.

**Tabla I.III.** Medios de cultivo usados, tipos de siembra, condiciones de incubación y referencias utilizadas para evaluar la calidad microbiológica general de los productos cárnicos objeto de estudio del capítulo I.

**Tabla I.IV.** Media de los resultados de los análisis físico-químicos del capítulo I, desviación estándar (DE), máximos y mínimos.

**Tabla I.V.** Resultados y tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los análisis físico-químicos del contenido en nitratos.

**Tabla I.VI.** Resultados de análisis físico-químicos de otros productos cárnicos.

**Tabla I.VII.** Influencia del loncheado sobre parámetros físico-químicos.

**Tabla I.VIII.** Influencia del envasado sobre parámetros físico-químicos.

**Tabla I.IX.** Recuentos medios globales de las detecciones y porcentajes de no detectados de los grupos microbianos analizados.

**Tabla I.X.** Tratamiento estadístico de los datos (sólo de las muestras donde se obtuvieron recuentos) agrupados según producto y grupo microbiano

**Tabla I.XI.** Influencia del loncheado sobre los valores microbiológicos de los embutidos cárnicos

**Tabla I.XII.** Influencia del envasado sobre los valores microbiológicos de los embutidos cárnicos

**Tabla I.XIII.** Influencia del envasado sobre los valores microbiológicos de las salazones cárnicas

- Tabla II.I.** Criterios de seguridad alimentaria de aplicación en productos cárnicos en la UE.
- Tabla II.II.** Primers, o cebadores, utilizados en la técnica de PCR para la detección de *Clostridium botulinum* en las muestras a estudio.
- Tabla II.III.** Primers, o cebadores, utilizados en la técnica de PCR para la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en las muestras a estudio.
- Tabla II.IV.** Medios de cultivo usados, tipos de siembra, condiciones de incubación, métodos y referencias utilizadas para cada uno de los grupos microbianos a estudio.
- Tabla II.V.** Resultados de los análisis microbiológicos de *Staphylococcus aureus* en productos cárnicos elaborados y comercializados en Castilla y León.
- Tabla II.VI.** Relación entre valores medios de parámetro físico-químicos y microbiológicos del total de muestras y de las muestras positivas a *Staphylococcus aureus* para cada tipo de producto.
- Tabla II.VII.** Relación entre valores medios de parámetro físico-químicos y microbiológicos del total de muestras y de las muestras positivas a *Salmonella* spp.
- Tabla II.VIII.** Resultados de la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante la aplicación de PCR a las muestras analizadas.
- Tabla II.IX.** Relación entre valores medios de parámetro físico-químicos y microbiológicos del total de muestras y de las muestras positivas *Listeria monocytogenes*.
- Tabla III.I.** Características generales de algunas especies del género *Staphylococcus*.
- Tabla III.II.** Programación del experimental de evaluación de la supervivencia de *S. aureus* inoculado en distintos productos cárnicos.
- Tabla III.III.** Resultados de los análisis físico-químicos de los productos a inocular.
- Tabla III.IV.** Resultados de los análisis microbiológicos de las muestras a inocular.
- Tabla III.V.** Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero de los productos inoculados con *Staphylococcus aureus*.

- Tabla III.VI.** Resultados de la evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en chorizo.
- Tabla III.VII.** Resultados de la evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en jamón.
- Tabla III.VIII.** Resultados de la evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en cecina.
- Tabla IV.I.** Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en condiciones ambientales adversas (Le Monnier y Leclerck, 2008).
- Tabla IV.II.** Casos de listeriosis en España (Servicio de Información Microbiológica, 2009).
- Tabla IV.III.** Resumen de la incidencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos comercializados en la Unión Europea en el año 2007 (EFSA y ECDC, 2009).
- Tabla IV.IV.** Programación del experimental de evaluación de la supervivencia de *Listeria monocytogenes* inoculada en distintos productos cárnicos.
- Tabla IV.V.** Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero de los productos inoculados con *Listeria monocytogenes*.
- Tabla IV.VI.** Resultados de la evolución del recuento y detección de *Listeria monocytogenes* inoculada en chorizo.
- Tabla IV.VII.** Resultados de la evolución del recuento y detección de *Listeria monocytogenes* inoculada en jamón.
- Tabla IV.VIII.** Resultados de la evolución del recuento y detección de *Listeria monocytogenes* inoculado en cecina.
- Tabla V.I.** Resumen de los grupos toxigénicos de *Clostridium botulinum* y de sus principales características (Peck *et al.*, 2004).
- Tabla V.II.** Principales características de los subgrupos de *Clostridium botulinum* (Bell y Kyriakides, 2005).
- Tabla V.III.** Características de los dos grupos fisiológicos de *Clostridium botulinum* más habitualmente implicados en el botulismo alimentario (Peck *et al.*, 2004).
- Tabla V.IV.** Programación del experimental de evaluación de la supervivencia de *Clostridium sporogenes* inoculado en distintos productos cárnicos.
- Tabla V.V.** Primers universales usados en la puesta a punto de la técnica de PCR y su correspondiente protocolo de termociclado.

- Tabla V.VI.** Primers o cebadores utilizados en la técnica de PCR para la detección de *Clostridium sporogenes* en la muestras a estudio.
- Tabla V.VII.** Composición, y utilidad de cada componente, de 10 ml de una dilución colorante con densidad para la carga de las muestras en el gel de electroforesis.
- Tabla V.VIII.** Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero de los productos inoculados con *Clostridium sporogenes*.
- Tabla V.IX.** Resultados de la evolución de *Clostridium sporogenes* inoculado sobre jamón.
- Tabla V.X.** Resultados de la evolución de *Clostridium sporogenes*  $10^2$  ufc/g inoculado sobre cecina.
- Tabla V.XI.** Resultados de la evolución de *Clostridium sporogenes*  $10^5$  esporas/g inoculado sobre cecina.
- Tabla V.XII.** Resultados de la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de la muestras a tiempo cero.
- Tabla V.XIII.** Resultados para la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de las muestras de chorizo inoculadas.
- Tabla V.XIV.** Resultados para la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de las muestras de jamón inoculadas.
- Tabla V.XV.** Resultados para la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de las muestras de cecina inoculadas con  $10^2$  ufc/g.
- Tabla V.XVI.** Resultados para la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de las muestras de cecina inoculadas con  $10^5$  ufc/g.
- Tabla VI.I.** Diagrama de flujo de la elaboración de la cecina, condiciones respetadas en cada etapa y muestreos realizados.
- Tabla VI.II.** Resultados de la medición del pH durante la elaboración de las cecinas.
- Tabla VI.III.** Resultados de la medición de la actividad de agua sobre la cecina B2 (cecina reserva) durante la elaboración.
- Tabla VI.IV.** Resultados de la medición de la actividad de agua en el  $t_6$  para todas las cecinas.
- Tabla VI.V.** Resultados de los análisis microbiológicos previos realizados sobre las babillas utilizadas como materia prima.



**Tabla VI.VI.** Resultados de la detección de *Clostridium sporogenes* durante la elaboración de las cecinas mediante cultivo en medio TPGY.



# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Valor económico de las industrias de alimentación, bebidas y tabaco por comunidades autónomas durante 2010.

**Figura 2.** Valor económico de las ventas de productos de industrias cárnicas durante el año 2007 (MAPA, 2007).

**Figura 3.** Mapa de la localización de las industrias cárnicas en Castilla y León (Gordo, 2003).

**Figura 4.** Emblema de la IFFA 2010.

**Figura 5.** Porcentaje de brotes en los que un producto cárnico fue identificado como origen del mismo en España entre 2004 y 2007.

**Figura 6.** Gráfico de la evolución de los resultados de la búsqueda de artículos que contienen la palabra PCR en PubMed (Bartlett y Stirling, 2003).

**Figura 7.** Kary Mullis, termociclador y *Thermus aquaticus*.

**Figura 8.** Esquema de las etapas básicas de un proceso de PCR (<http://www.mylaboratorio.blogspot.com>).

**Figura 9.** Fases del desarrollo de la PCR a tiempo real (<http://www.biotechniques.com>).

**Figura I.I.** Comparación entre parámetros físicos-químicos de productos envasados y no envasados

**Figura I.II.** Comparación entre parámetros físico-químicos de productos loncheados y en pieza

**Figura I.III.** Recuentos medios para cada grupo microbiano y tipo de producto.

**Figura I.IV.** Porcentaje de no detectados para cada grupo microbiano en cada tipo de producto

**Figura I.V.** Relación entre resultados de análisis microbiológicos para MAMV y MS.

**Figura I.VI.** Nitratos y nitritos en el etiquetado de los productos cárnicos analizados.

**Figura II.I.** Evolución de los principales serotipos y serogrupos de *Salmonella*, de 53.801 casos notificados al SIM entre los años 2000-2008 (CNE, 2009).

**Figura II.II.** Relación entre valores medios de parámetro físico-químicos y microbiológicos del total de muestras y de las muestras positivas a *Salmonella* spp.

**Figura II.III.** Colonias en medio Cromogénico Listeria desde caldo A.

**Figura II.IV.** Porcentajes de patógenos identificados por técnicas inmunológicas o bioquímicas respecto al total de las muestras analizadas.

**Figura III.I.** Morfología de colonias de *Staphylococcus aureus* en placa de medio Baird Parker.

**Figura III.II.** Evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en chorizo.

**Figura III.III.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en el chorizo envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura III.IV.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en el chorizo envasado en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación

**Figura III.V.** Evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en jamón.

**Figura III.VI.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en el jamón envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura III.VII.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en el jamón envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura III.VIII.** Evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en cecina.

**Figura III.IX.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura III.X.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura IV.I.** Morfología característica de colonias de *Listeria monocytogenes* en placa de Agar Cromogénico Listeria (Oxoid).

**Figura IV.II.** Evolución de *Listeria monocytogenes* inoculada en chorizo.

**Figura IV.III.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en el chorizo envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura IV.IV.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en el chorizo envasado en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación

**Figura IV.V.** Evolución de *Listeria monocytogenes* inoculada en jamón.

**Figura IV.VI.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en el jamón envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura IV.VII.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en el jamón envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura IV.VIII.** Evolución de *Listeria monocytogenes* inoculada en cecina.

**Figura IV.IX.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura IV.X.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura V.I.** Morfología de colonias de *Clostridium sporogenes* en placa con medio TPGY.

**Figura V.II.** Evolución de *Clostridium sporogenes* en muestra de jamón.

**Figura V.III.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* en el chorizo envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura V.IV.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* en el chorizo envasado en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.

**Figura V.V.** Evolución de *Clostridium sporogenes* inóculo  $10^2$  esporas/g en muestra de cecina.

**Figura V.VI.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* inoculado a  $10^2$  esporas/g en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura V.VII.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* inoculado a  $10^2$  esporas/g en la cecina

envasada en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.

**Figura V.XIII.** Evolución de *Clostridium sporogenes* inóculo  $10^5$  esporas/g en muestra de cecina.

**Figura V.IX.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* inoculado a  $10^5$  esporas/g en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.

**Figura V.X.** Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* inoculado a  $10^5$  esporas/g en la cecina envasada en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.

**Figura V.XI.** Revelado con bromuro de etidio de gel de azarosa con diluciones de la suspensión madre de *Clostridium sporogenes*.

**Figura VI.I.** Evolución de la producción de Cecina de León.

**Figura VI.III.** Pieza de cecina de babilla, cara anterior.

**Figura VI.IV.** Inoculación de las babillas.

**Figura VI.V.** Obtención de las muestras.

**Figura VI.VI.** Evolución del pH durante la elaboración de la cecinas.

**Figura VI.VII.** Evolución de las inoculaciones de  $10^2$  ufc de *Clostridium sporogenes* durante el proceso de elaboración de la cecina.

**Figura VI.VIII.** Evolución de las inoculaciones de  $10^5$  ufc de *Clostridium sporogenes* durante el proceso de elaboración de la cecina.



# **INTRODUCCIÓN**





# INTRODUCCIÓN

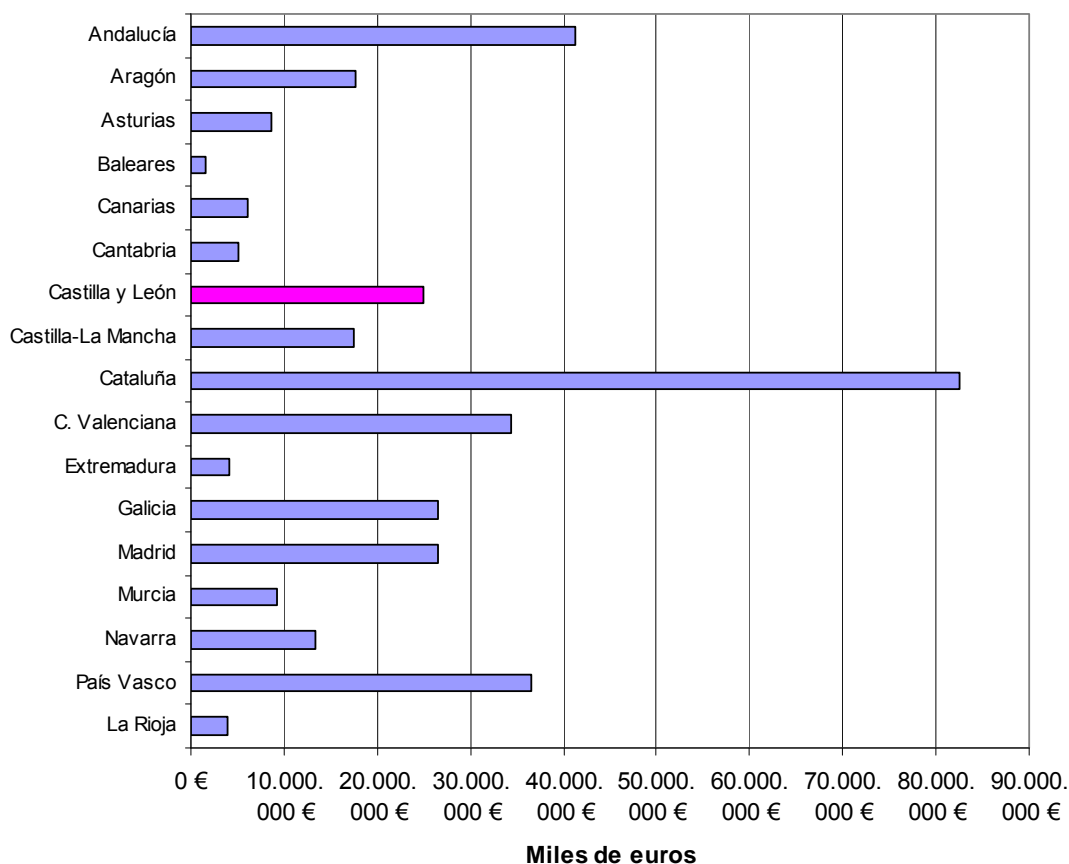
El sector cárnico tiene una gran importancia para la economía de la comunidad autónoma de Castilla y León, constituyendo, especialmente sus productos cárnicos crudo-curados, una parte notable de su cultura y tradición alimentarias. Además, en este sector se está produciendo una constante innovación influenciada por el continuo auge del envasado en la distribución de los alimentos. Esta tendencia conlleva posibles riesgos que a su vez generan un razonable interés social y gubernamental sobre su calidad higiénica y sus garantías de seguridad.

Por otro lado, se da una continua evolución, casi exponencial, de la tecnología en el ámbito de la investigación y de sus aplicaciones prácticas en el campo de la alimentación, que serán utilizadas en el desarrollo del presente experimental.

## **1. El interés económico de los productos cárnicos crudo-curados y salazones cárnicas elaborados en Castilla y León**

La **industria alimentaria** no sólo representa un sector muy importante de la economía en la comunidad autónoma de Castilla y León, si no que también es considerada como una de las locomotoras de la industria agroalimentaria nacional. Teniendo en cuenta la posición que ha ido manteniendo a lo largo del tiempo en relación al resto de las comunidades autónomas, su grado de especialización alimentaria y la evolución de la cifra de ventas se puede estimar que esta autonomía mantiene una de las posiciones más favorables en este sector respecto a las de otras regiones españolas (Gordo, 2003). Utilizando las referencias productivas del INE, la cuota de participación de la industria alimentaria regional con relación al total de volumen económico del país es del 6,9%, ocupando los primeros lugares después de otras comunidades como Cataluña o Andalucía, como puede observarse en la figura 1 (INE, 2010).

**Figura 1. Valor económico de las industrias de alimentación, bebidas y tabaco por comunidades autónomas durante 2010.**



Fuente: Encuesta Industrial de Productos 2010. [www.ine.es](http://www.ine.es)

Por lo que se refiere propiamente a Castilla y León, en las tres últimas décadas esta actividad económica ha ido consolidándose como un sector clave de desarrollo para la comunidad autónoma, no sólo por la fuerte ligazón que tiene con el sector agrario como principal abastecedor de materias primas, si no también porque representa el eslabón principal del sistema de transformación y distribución de alimentos, aportando una proporción considerable de la riqueza y los puestos de trabajo generados dentro del sistema productivo regional. En 2003 el número total de personas empleadas era algo más de unas 32.500 y su producción bruta estaba por encima de los 6.000 millones de euros (Gordo, 2003). Entre 2004-2009 incrementó el empleo en este sector en un 8%, creando 2.724 puestos de trabajo más.

Por otro lado, en relación a la industria alimentaria en general, también es interesante tener en consideración que la gran estabilidad del consumo de alimentos en

los países desarrollados es un hecho generalizado y constable, de modo que las empresas de este sector no pueden esperar fácilmente cambios en la demanda sustanciales y cuantitativos que les permitan aumentar significativamente su cifra de ventas. Pero, en contrapartida, en el sector alimentario en épocas de crisis económica, como la actual, las cifras de ventas resisten mucho mejor las oscilaciones de la demanda, lo que proporciona estabilidad económica a las regiones donde esta tipo de industria es importante. Según la Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB, 2009), aunque a nivel europeo toda la industria de la alimentación ha sufrido la crisis económica, una vez más ha demostrado un comportamiento más estable incluso que el de otros países como Francia o Alemania, donde el crecimiento medio fue menor y la volatilidad mayor. Siempre según la FIAB, la industria alimentaria ha demostrado ser un sector estratégico para la economía y tener capacidad de ser uno de los motores para salir de la crisis. Durante el año 2009 fue el sector donde se siguieron produciendo ventas y compras de compañías a pesar de la crisis económica, atrayendo 225 millones de inversión extranjera, lo que supone triplicar la cifra respecto a 2008 en un contexto donde se produjo una contracción de la inversión extranjera del 60%

Dentro de la industria alimentaria regional **las industrias cárnicas** representan el sector más importante, con un 29,30% del total de ventas y un 36,15% del total de empleados. Otros datos económicos relativos a esta actividad económica avalan la importancia de esta industria, pues alcanza una facturación próxima a los 2.600 millones de euros anuales, lo que responde a una producción cárnica de cerca de 700.000 toneladas (Rodríguez-Rebollo, 2008), creando alrededor de 13.869 puestos de trabajo (MAPA, 2007). Pero además, la industria cárnica ha incrementado notablemente la producción (Junta Castilla y León, 2011a). Otras características económicas relativas a las industrias cárnicas de la región y su relación respecto a las mismas características a nivel nacional quedan recogidas en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características económicas de las industrias cárnicas de Castilla y León, y de España (2007).**

	<b>Castilla y León</b>	<b>España</b>
<b>Nº de empresas</b>	850	4.418
<b>Nº de personas</b>	13.869	85.624
<b>Ventas productos (miles €)</b>	2.199.816	15.904.665
<b>Negocios (miles €)</b>	2.638.163	18.531.901
<b>Gasto personal (miles €)</b>	331.798	2.043.458
<b>Valor añadido (miles €)</b>	587.994	3.558.205
<b>Productos/persona (miles €)</b>	158.613	185.750
<b>Gastos/persona (miles €)</b>	23.923	23.865

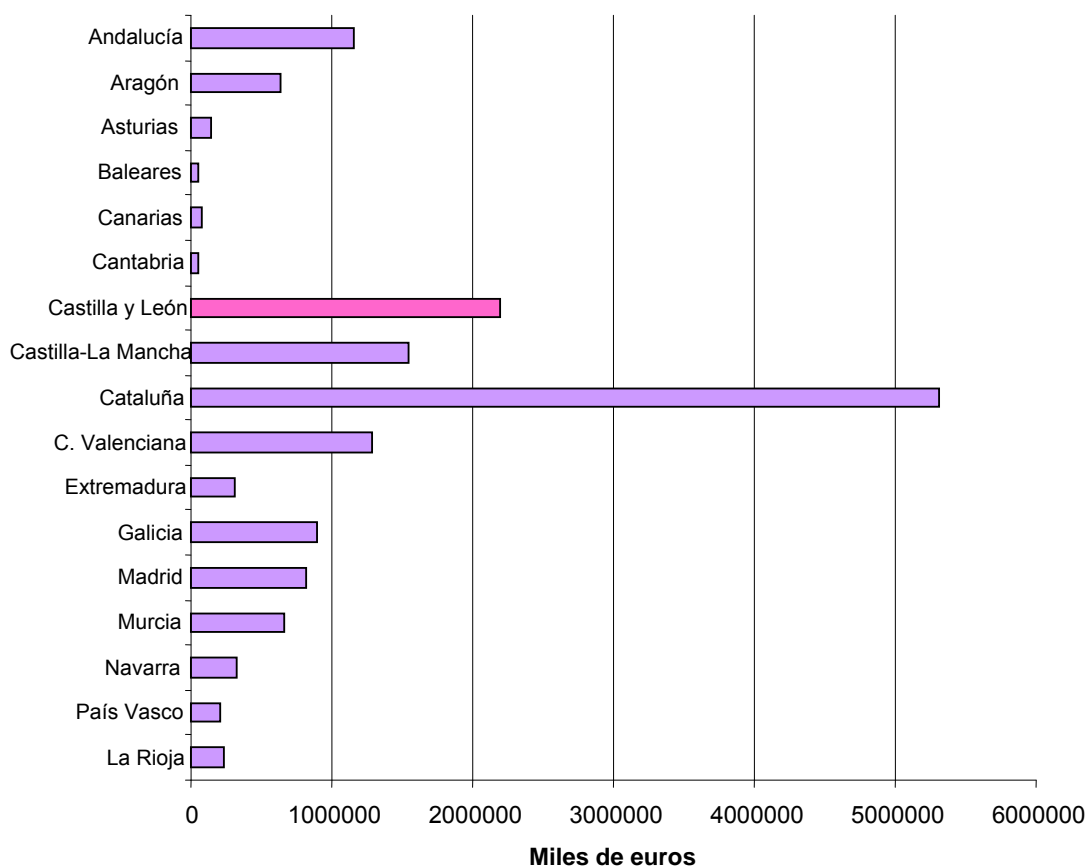
Fuente: MAPA sobre datos del INE (Rodríguez-Rebollo, 2008)

También con respecto a la industria cárnica española, como sucede con la alimentaria en general, la industria cárnica regional tiene un peso específico importante, como queda reflejado en los datos relativos a la venta de productos de las industrias cárnicas recogidos en la Figura 2. En Castilla y León las 859 empresas cárnicas existentes suponen el 19,46% del total a nivel nacional (Junta Castilla y León, 2011a).

Por lo que respecta a las características generales de la industria de la elaboración de la carne en Castilla y León, ésta incluye un elevado número de actividades que van desde la obtención de la materia prima procedente de las diversas especies ganaderas en los mataderos y salas de despiece, hasta los establecimientos dedicados a la preparación de la carne para el consumo en una gama muy variada de productos, entre los que destacan los embutidos, conservas, curados, jamones, salazones y platos preparados. Según el Registro de Industrias Agrarias el conjunto de actividades que integran el sector cárnico agrupa a unas 1150 empresas entre industrias cárnicas y almacenes frigoríficos, que se distribuyen en unos 417 núcleos poblacionales dispersos por todo el territorio regional, como se puede apreciar en la Figura 3 (Gordo, 2004).

Hay que destacar que la industria cárnica ha creado cerca de 1000 nuevos puestos de trabajo entre los años 1998-2004 según las Cuentas del Sector Industrial que publica la Junta de Castilla y León, dato relevante si se tiene en cuenta la gran estabilidad que suele tener la creación de empleo en cualquier actividad de transformación alimentaria.

**Figura 2. Valor económico de las ventas de productos de industrias cárnicas durante el año 2007.**

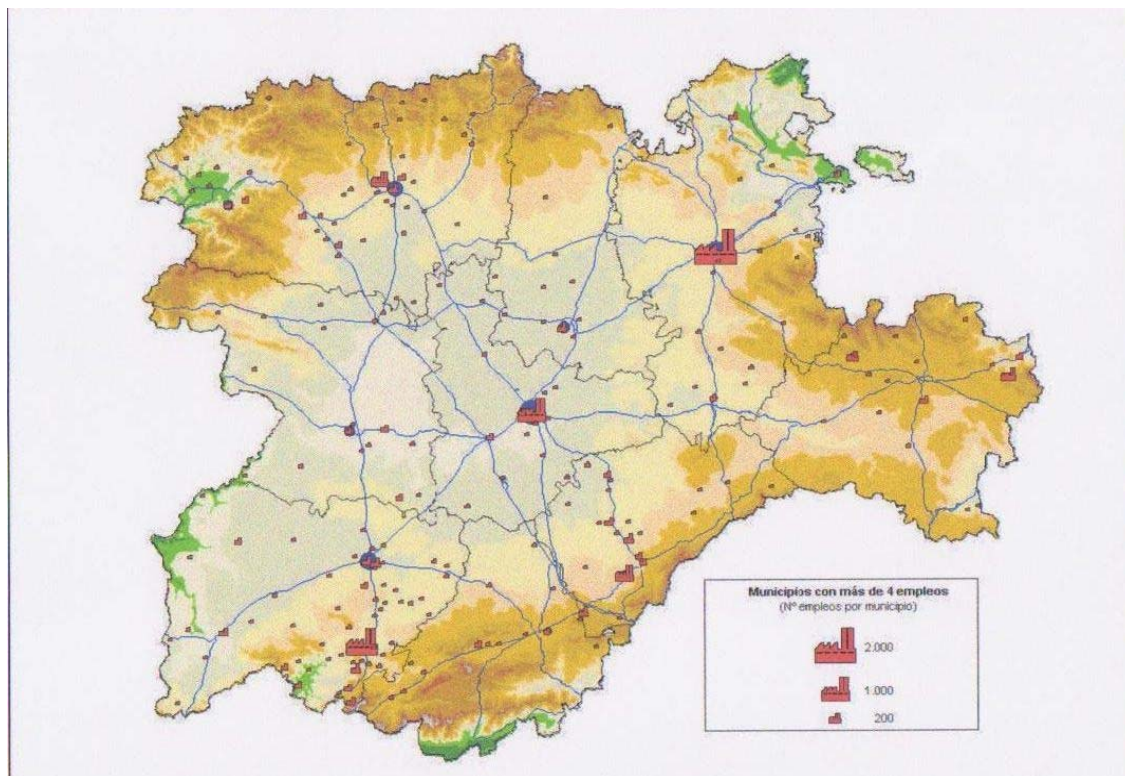


Fuente: MAPA, 2007 (Rodríguez-Rebollo, 2008).

Respecto al tamaño de la mayoría de los establecimientos del sector según el número de empleados, este es bastante reducido, puesto que, como viene siendo habitual en el ámbito nacional y en la mayoría de los países de la Unión Europea, es muy elevado el número de empresas cárnicas cuya plantilla es inferior a 10 trabajadores. En concreto, la media se ha elevado en Castilla y León de 8 a 10 empleados en los últimos años, pero sigue siendo inferior a la media del país, en torno a unos 13 trabajadores por empresa. Aproximadamente el 60% de los establecimientos

no supera los 5 trabajadores, lo que tiene el inconveniente de dificultar la capitalización y la eficiencia productiva de las empresas (Gordo, 2004).

**Figura 3. Mapa de la localización de las industrias cárnicas en Castilla y León.**



Fuente: Elaborado por Gordo a partir de datos del Registro de Industrias Agrarias de Castilla y León (2003).

Por otro lado es un sector con una trayectoria claramente positiva, tanto en el volumen inversor como por la tendencia creciente observada a lo largo de los últimos años. Un número cada vez mayor de firmas pequeñas y medianas, junto a las grandes del sector, realizan continuos esfuerzos de adaptación de sus instalaciones y mejoras en los productos para competir en los mercados. Este esfuerzo es apoyado por la Administración, que en el año 2011 presupuestó un total de 14.299.358 euros en ayudas y financiación, el 48,17% del total de las ayudas al sector agroalimentario (Junta de Castilla y León, 2011b).

Un aspecto a destacar es que debido a su gran interrelación con el sector agrario primario, supone un arrastre positivo de este sector, tradicionalmente más deprimido, porque hasta el 60% de las materias primas usadas en la elaboración de productos cárnicos procede de diversas explotaciones ganaderas en la misma región,

lo que contribuye a su desarrollo y fijar la población de núcleos rurales, evitando la despoblación de los mismos, uno de los objetivos de la Política Agraria Europea y de nuestro Gobierno Autonómico.

Otra característica de la industria cárnica regional es que la mayor parte de los recursos generados por estas empresas se emplean básicamente en la demanda final, de modo que su evolución viene determinada por la evolución de la demanda de consumo de los productos cárnicos por parte de las familias españolas.

En la actualidad existe un cierto estancamiento en cuanto al gasto medio por hogar, lo que implica cierta dificultad por parte de las industrias alimentarias para obtener incrementos en su cifra de ventas, a no ser que sean capaces de desplazar a la competencia a través de nuevos productos, de mayor calidad, seguros desde el punto de vista sanitario, considerando también la originalidad y el valor dietético, ya sea en los mercados nacionales o tratando de conseguir una mayor integración en los mercados exteriores. En relación a este último punto, en las exportaciones de productos cárnicos se viene observando desde 1998 un intenso y regular crecimiento de las ventas al exterior por parte de las empresas de la región, en casi todos los productos, destacando por el volumen de intercambios las carnes de porcino, ovino, así como las carnes saladas. Los países de destino corresponden en su mayoría a nuestros socios comunitarios.

Además de la mejora de los procesos de comercialización, una de las grandes bazas de productores e industriales del sector cárnico para aumentar las ventas es aprovechar al calidad y singularidad de muchos de los productos amparados en los **sistemas de valorización y protección de la calidad alimentaria en la UE** (*Denominación de Origen Protegida, Indicación Geográfica Protegida y Especialidad Tradicional Garantizada*), con la finalidad de facilitar su comercialización y atender a la demanda que tienen estos productos, debido a su garantía de procedencia, calidad y diferenciación local (Gordo, 2004).

Este tipo de productos han llegado a convertirse en parte de la imagen de las regiones que los producen, además de ejercer un efecto muy positivo en la economía local, con una buena facturación y generando puestos de trabajo. La demanda parece



mostrar una tendencia favorable para este tipo de productos, dada la seguridad que busca el consumidor en términos de calidad y sanidad, frente a las producciones cárnicas más estandarizadas (Gordo, 2004). Los productos cárnicos de Castilla y León acogidos a IGP o DO están recogidos en la Tabla 2.

**Tabla 2. IGPs y DOs de productos cárnicos de Castilla y León.**

<b>Denominación (año de concesión)</b>	<b>Valor económico (millones €)</b>
<b>IGPs de carnes frescas</b>	
Carne de Ávila (1988)	1.93
Carne de Morucha de Salamanca (1995)	0.7
Lechazo de Castilla y León (1997)	3.67
<b>DOPs e IGPs de jamón</b>	
Guijuelo (1984)	39.64
<b>IGPs de embutidos</b>	
Botillo del Bierzo (2000)	0.88
Chorizo de Cantimpalos (2006)	-
<b>IGPs de otros productos cárnicos</b>	
Cecina de León (1994)	9.79

Fuente: MAPA, 2005 (Rodríguez-Rebollo, 2008) y Junta de Castilla y León, 2011a.

Es esta seguridad alimentaria que busca el consumidor uno de los aspectos más importantes de cualquier producto alimenticio y él que más nos interesa en el presente trabajo de investigación, pues es, en general, uno de los puntos más débiles de la industria alimentaria. El consumidor del sector alimentario suele verse muy influenciado por la publicidad negativa o por la difusión de información acerca de fraudes, intoxicaciones o brotes alimentarios. La pérdida de confianza del consumidor se traduce en pérdidas económicas importantes y es, además, un cliente difícil de recuperar. Además, también es responsabilidad de los gobiernos y objetivo de la legislación comunitaria y nacional lograr un nivel elevado de protección de la vida y la salud de las personas.

## **2. Nuevos sistemas de envasado y distribución: el envasado en atmósferas modificadas.**

Como ya ha sido comentado en el apartado económico de esta introducción, la demanda de productos alimenticios en general, y también la de los cárnicos, se ha estabilizado y los empresarios se ven en la necesidad de ofrecer productos o formatos nuevos que ocupen nichos de mercado diferentes y estimulen el consumo. Dentro de esta variedad de nuevos productos cabe destacar aquellos en los que se han producido **cambios en la presentación tradicional**. Respecto a estos cambios, una tendencia muy actual en el consumo de alimentos es la comercialización de productos como los Listos Para su Consumo, LPC (o RTE, de las siglas en inglés Ready To Eat). Este tipo de productos disfrutan de un más que notable aumento en la demanda debido, entre otros factores, a la incorporación de población joven al consumo, a la disminución en las habilidades culinarias y al poco tiempo disponible para la preparación casera de la comida (Eilert, 2005). El reglamento (CE) 2073/2005 define a los alimentos listos para el consumo como aquellos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos (CE, 2005). No sólo no necesitan preparación culinaria, sino que van presentados para poder ser consumidos directamente desde el envase, sin necesidad de ningún tipo de manipulación.

Este tipo de productos LPC, y en concreto las nuevas presentaciones en loncheados, destacan especialmente en el sector cárnico y son utilizados como una de las estrategias para estimular el consumo, presentando unas tasas de crecimiento interanual en torno al 10% en la distribución moderna, constituyendo, la carne fresca y los embutidos cárnicos envasados en atmósfera protectora, el segmento de mayor crecimiento dentro del sector de los envases y embalajes de plástico. Destacan especialmente en el mercado del jamón curado la presentaciones en loncheados, tacos y tiras, donde han aumentado las ventas más en un 8% y representan ya algo más de un 25% de todo este mercado (Anónimo, 2010).

Estas nuevas presentaciones suponen para la industria alimentaria, y también para la cárnica, nuevos retos en la distribución de este tipo de productos, ya que debe

buscar nuevos sistemas que incrementen la vida útil del producto pero que mantengan sus características sensoriales y de calidad sanitaria dentro de unos márgenes aceptables tanto para el consumidor como para las Autoridades Sanitarias.

Como consecuencia de estas nuevas tendencias e innovaciones, en nuestra sociedad actual el envasado es omnipresente y esencial. Envuelve, mejora y protege los alimentos ya desde su procesado, durante su almacenamiento y distribución, y hasta su llegada al consumidor final, utilizándose, generalmente, en casi todas las etapas de la cadena de elaboración de un alimento. Es tal la presencia del envasado en nuestra vida cotidiana que incluso se puede afirmar que, sin el mismo, el presente mercado de consumo de alimentos en los países desarrollados no sería posible.

Un dato que refleja la magnitud del envasado en parámetros económicos es que representa el 2% del Producto Interior Bruto (PIB) de la mayoría de los países desarrollados y que prácticamente la mitad de esta producción se utiliza en el envasado de alimentos (Robertson, 2006). Este supuesto 1% puede parecer poco significativo, pero si lo comparamos con el 8% que supone la industria de alimentación y bebidas respecto al PIB español, según la Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas (FIAB, 2009), podemos claramente observar el peso del envasado en el moderno consumo de alimentos.

En cuanto a las funciones básicas del envasado alimentario, éstas fueron definidas así por el Codex Alimentarius en 1985: “El alimento es envasado para preservar su calidad y frescura, resultar más atractivo al consumidor y facilitar el almacenamiento y la distribución”. Y en estos últimos 20 años se ha visto modificado lo que se entiende por envasado de alimentos, pues para otros autores como Robertson (2006) y Yam, Takhistov y Miltz (2005) éste debe cumplir ya cuatro funciones básicas: contener, proteger, comunicar y conveniencia. Y es esta última y reciente función la que, sin embargo, tiene mayor repercusión en el sector del envasado, pues casi todas las innovaciones que se están produciendo constantemente tienen su origen en la adaptación continua del sector a la demanda generada por los nuevos hábitos de consumo, en los cuales se observa un marcado aumento en la compra de los productos denominados “de conveniencia”. Y en concreto, respecto al sector de la carne y los

productos cárnicos, para Langowski (2010) la tendencia más significativa en este sector es la evolución hacia la presencia de un mayor número de productos de conveniencia.

De entre estos nuevos sistemas que incrementan la vida útil del producto destaca el envasado en atmósfera modificada, MAP, de sus siglas en inglés *Modified Atmosphere Packaging*, con una gran aceptación entre los consumidores que buscan productos más frescos y naturales, con menor contenido en aditivos y que conserven sus propiedades nutritivas y organolépticas tras el procesado (García, 2006).

Se debe indicar que no hay uniformidad de criterios en cuanto a la denominación de este tipo de envasado, ya que, aunque el R.D. 1334/1999 cita que son *los productos cuya duración se ha prolongado por el empleo de gases de envasado y en los que debe añadirse obligatoriamente la indicación “envasado en atmósfera protectora”*, en términos técnicos y en la documentación en inglés se suele usar más el término *modified* o modificada.

Respecto a la definición del envasado en atmósferas modificadas, en el sentido general de la expresión, se entiende que es un método de empaquetado que implica modificar el medio gaseoso de los alimentos y/o de su entorno con el fin de prolongar su vida comercial (Jay, 2002). Pero, al igual que hemos visto para la denominación de este sistema, tampoco en lo referido a lo que se entiende por MAP hay un criterio único. Para otros autores el MAP consiste, única y exclusivamente, en la eliminación y/o reemplazo de la atmósfera que envuelve al producto antes de su sellado dentro de materiales impermeables al vapor (McMillin, 2008).

En general, el envasado en atmósferas modificadas se realiza de distintas maneras en las cuales el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) es, principalmente, el agente usado como conservador. Su efecto sobre de alimentos ya es conocido y está documentado sobre productos vegetales desde 1821 (Smith, 1963) y su efecto para prolongar la vida comercial de las carnes frescas se demostró ya en 1882, determinándose su actividad antimicrobiana en 1889 y ya desde 1910 el envasado en atmósferas modificadas fue usado con regularidad para la conservación de determinados alimentos.

Como ya hemos visto, no hay un gran consenso en la terminología que se usa para definir los distintos sistemas de envasado en los que la atmósfera que envuelve a los alimentos se ve modificada, pero dentro de aquellas clasificaciones cuyo uso está más extendido (Jay, 2002) se distinguen las siguientes:

- almacenaje hipobárico
- envasado a vacío
- envasado en atmósfera modificada propiamente dicha
- envasado en atmósfera modificada en equilibrio
- envasado o almacenaje en atmósfera controlada

De todos estos tipos de envasado nos interesan, por ser las más frecuentes y tener mayor repercusión, principalmente dos: el envasado a vacío y el envasado en atmósferas modificadas.

En el envasado al vacío el aire es eliminado del interior de bolsas impermeables al gas que después de cierran. Esto tiene el efecto de reducir la presión de aire residual desde el habitual 1 bar a 0,3-0,4 bar y de este modo es eliminado algo de oxígeno. Durante el almacenado del producto así envasado se produce un aumento del CO<sub>2</sub> como consecuencia de la respiración tanto del tejido como de la actividad microbiana, donde se consume O<sub>2</sub> y se libera CO<sub>2</sub> en igual volumen, que en el caso de las carnes puede llegar a alcanzar el 30 % (Gardner *et al.*, 1967). Este tipo de envasado además de retardar el crecimiento de los microorganismos aeróbicos causantes de alteración, también reduce al mínimo la retracción de los productos y retarda tanto la oxidación como el cambio de color de los mismos.

El envasado en atmósfera modificada, en el sentido específico de la expresión, es un proceso hiperbárico que consiste en la modificación de la atmósfera del envase llenándola con varias mezclas de CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>. Se pueden distinguir dos tipos de MAP en función de la concentración de oxígeno: con una concentración rica en O<sub>2</sub> de hasta el 70%, junto con concentraciones entre el 20-30 % de CO<sub>2</sub> y el 0-20 % de N<sub>2</sub>, y las pobres en O<sub>2</sub>, con niveles de hasta el 10 % de O<sub>2</sub> (Gill y Mollin, 1998).

Son muchas las ventajas que presenta el envasado en atmósferas modificadas, como pueden ser:

- un importante incremento de la vida útil del producto
- una notable reducción de desechos a nivel de detallista
- la mejoría en la presentación comercial, con una clara visión del producto
- el permitir un apilado higiénico de los envases, cerrados y libres del goteo y con ausencia de olor
- su fácil separación en lonchas
- una disminución en la necesidad de conservantes químicos
- una notable reducción de costes de mano de obra en la venta al detalle (ACITA, 2002).

Pero también se debe que indicar que tiene algunos inconvenientes de interés, como el aumento en los costes tanto de maquinaria y de material fungible de envasado, y la generación de una gran cantidad de residuos plásticos. Y de todos los inconvenientes que puede presentar el envasado el más importante, para nuestro trabajo de investigación, es **el posible crecimiento de patógenos y/o la producción de toxinas en los alimentos envasados**. Las constantes manipulaciones que sufre el producto antes de su envasado ya suponen un riesgo constante de contaminación (FSIS, 2006) pero, además, los excesos de temperatura a que pueden ser sometidos este tipo de productos tanto por los distribuidores como por los propios consumidores (Han, 2005) suponen el posible desarrollo sobre el alimento envasado de microorganismos contaminantes. En este punto nos encontramos con el problema de que muchas veces la tecnología llega antes que las investigaciones en materia de seguridad sanitaria (Brody, 1996) y que el conocimiento de los efectos de las atmósferas modificadas sobre los microorganismos patógenos alimentarios todavía es incompleto.

Volviendo a referirnos concretamente al sector cárnico, la gran importancia que dentro de éste tiene el envasado queda claramente reflejada en el emblema elegido por la IFFA (Feria Mundial para la Industria Cárnica) feria líder en la industria de la carne de los últimos 50 años, para su feria del año 2010, que es un envase que contiene una mapa mundial de carne, como puede verse en la figura 4.

**Figura 4. Emblema de la IFFA 2010.**



Ha sido el sector cárnico uno de los primeros en aplicar las tecnologías de envasado en atmósferas modificadas, sirviendo como ejemplo que ya en 1938 en Nueva Zelanda y Australia se realizaba el 50% del transporte de carne en atmósferas de CO<sub>2</sub> (Jay, 2002). Actualmente se utiliza en todo tipo de productos cárnicos, desde los crudos, hasta los cocidos y los crudo-curados, para preservarlos del deterioro microbiano y oxidativo. Como ya hemos dicho, en algunos productos, como el jamón, este tipo de presentación puede llegar a suponer el 25 % de las ventas.

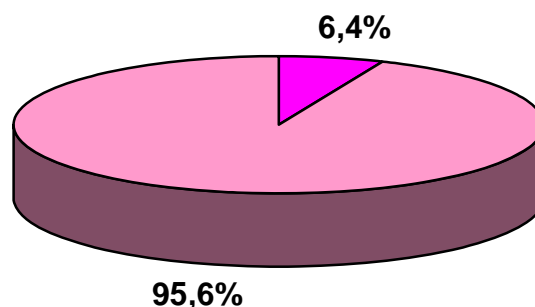
Sin embargo, se siguen planteando dudas acerca de la seguridad microbiológica de los alimentos cárnicos envasados, ya que al prolongar su vida útil y modificar la atmósfera en la que están contenidos, pueden darse las condiciones para el posible desarrollo de microorganismos patógenos. En microorganismos de gran interés como *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes* se han realizado varios estudios relativos a su comportamiento en cárnicos envasados bajo condiciones MAP, pero considerando la gran proliferación de estos nuevos sistemas de envasado, es imprescindible continuar realizando nuevos y serios estudios acerca de la seguridad microbiológica este tipo de productos.

### 3. Principales patógenos asociados al consumo de productos cárnicos crudo-curados y salazones cárnicas.

Los productos cárnicos crudo-curados y las salazones cárnicas tradicionalmente han sido considerados como alimentos seguros debido a características propias de los mismos como su baja actividad de agua, el proceso de fermentación que ayuda a inhibir el crecimiento de patógenos, la presencia de sal, nitratos y nitritos y, en el caso de los embutidos, su bajo pH. Estos productos tienen un buen registro de inocuidad (Jay, 2002; Bell y Kryiakides, 2005), habiéndose visto asociados a pocos brotes alimentarios, a excepción de los producidos por parásitos como la triquina (*Trichinella spiralis*), ya que, generalmente, durante el curado se vuelven alimentos más estables y seguros como consecuencia de la sucesión de barreras de crecimiento microbiano (Leistner, 1995). En concreto, los embutidos fermentados se consideran generalmente productos de bajo riesgo a causa de la reducción de los valores de pH y  $a_w$ , capaces de inhibir a los microorganismos patógenos incluso a temperatura ambiente (Barbutii y Parolari, 2002).

Pero a pesar de esta relativa seguridad sanitaria sí pueden estar, y están a veces, relacionados con enfermedades de transmisión alimentaria, siendo la carne y los productos cárnicos los alimentos implicados como vehículo de transmisión en un 6,4% de los brotes registrados en los que se conocía el alimento fuente de la infección, en un período de tiempo comprendido entre los años 2004-2007 (CNE, 2008). Un ejemplo puntual de estas intoxicaciones asociadas a productos cárnicos fue el brote de botulismo vinculado a una pieza de cecina, producida y envasada en León, que en el año 2005 causó tres casos leves de botulismo en Vigo (AESAN, 2005). Este brote fue uno de los detonantes de este trabajo de investigación, dada la trascendencia económica de los productos cárnicos en esta

**Figura 5. Porcentaje de brotes en los que un producto cárnico fue identificado como origen del mismo en España entre 2004-2007**





región, ya que generó alarma social y tuvo cierta repercusión económica sobre algunas empresas cárnicas de la región.

La existencia de estos brotes, los cambios en los sistemas de distribución y presentación de productos y el hecho de que los consumidores buscan productos más seguros, alarmados ante las últimas crisis alimentarias europeas, hacen que la preocupación por el papel de los productos cárnicos como causa de toxiinfecciones alimentarias esté aumentando en lugar de disminuir (ICMSF, 1985), por lo tanto, nuevas investigaciones que profundicen en el conocimiento del comportamiento de microorganismos patógenos en estos productos son útiles y necesarias.

Por lo que respecta a los microorganismos patógenos implicados en toxiinfecciones alimentarias transmitidas por productos cárnicos se debería empezar por los patógenos de la carne cruda pues, aunque los problemas microbiológicos de las carnes crudas son completamente distintos de los de los productos cárnicos (ICMSF, 1985), constituyen una fuente importante de contaminación de la materia prima con la que se elaboran los productos cárnicos.

Las bacterias patógenas que pueden encontrarse en la carne fresca habitualmente son *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* enteropatógeno y, ocasionalmente, *Clostridium botulinum* (ICMSF, 1985). También se encuentran con frecuencia bacterias entéricas como coliformes y estreptococos fecales, que junto algunos virus intestinales, indican la contaminación de procedencia intestinal de la carne.

Algunas de estas bacterias se han frecuentemente visto implicadas en brotes alimentarios vehiculados por la carne fresca, como *E. coli* VTEC (Varnam y Sutherland, 1998), pero también son objeto de interés por su posible supervivencia durante el proceso de elaboración de los productos cárnicos, salazones cárnicas y embutidos, a pesar de las barreras al desarrollo y supervivencia de los mismos que estos presentan: la acción bacteriostática de la sal común, el efectos inhibitor de los nitritos, de la disminución de la actividad de agua y las modificaciones en el pH.

Por lo que respecta a las carnes crudas curadas, las producidas comercialmente tienen un historial de seguridad muy bueno, si bien es cierto que algunos patógenos se aíslan con frecuencia, como *Staphylococcus aureus* (Varnam y Sutherland, 1998) del que, aunque muy pocos, si han sido documentados brotes asociados al consumo de jamones contaminados con este microorganismo (CDC, 1983; Uterman y Müller, 1998). En el caso de los embutidos fermentados, la producción de enterotoxina por *S. aureus* si constituye un problema importante si la fermentación se retrasa, pues el crecimiento y la formación de enterotoxina son rápidos, y aunque el microorganismo posteriormente muere, por la presión de la flora competitiva, la enterotoxina puede permanecer durante periodos prolongados dando lugar a intoxicaciones. E incluso, a pesar de las condiciones de control que se dan en este tipo de productos, ha sido documentado un brote de intoxicación alimentaria por este microorganismo en el que el crecimiento y producción de la enterotoxina se produjo en el embutido fermentado ya terminado (Uterman y Müller, 1998).

Otro microorganismo patógeno que ha sido aislado en productos cárnicos es *Salmonella* spp. En salazones cárnicas esta bacteria suele presentar una baja incidencia (Varnam y Sutherland, 1998) y, supuestamente, aunque pueda persistir no se desarrolla. Sin embargo, si hay por lo menos dos brotes documentados de *Salmonella enterica* serovar Newport en dos países, Finlandia y Reino Unido, donde la relación epidemiológica encontrada entre la enfermedad y la exposición fue el jamón curado (Lyytikäinen *et al.*, 2000). Sin embargo, en el caso de embutidos fermentados, aunque las condiciones del embutido normalmente no permiten la multiplicación de *Salmonella*, han sido documentados numerosos brotes de intoxicación alimentaria por este microorganismo, en Australia, Italia y Reino Unido entre otros, después del consumo de salamis (Varnam y Sutherland, 1998), siendo uno de los más recientes el ocurrido en Estados Unidos en 2010 (CDC, 2010).

Respecto a la información sobre la presencia de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos, es interesante indicar que en la bibliografía tradicional (de antes del 2000), apenas aparece mencionado como patógeno habitual de estos productos, debido, probablemente, a que es un patógeno emergente apenas estudiado en el ámbito de la microbiología alimentaria antes de los años 90. Sin embargo, debido al auge de los productos cárnicos loncheados y envasados listos para su consumo entre

otros factores, actualmente se reconoce como un gran problema de interés para la sanidad pública, y ha ido aumentando notablemente la incidencia de brotes asociados a estos productos, siendo actualmente una de las principales causas de preocupación en los cárnicos RTE (Sofos, 2008). En el caso de las salazones cárnicas como el jamón, estudios recientes confirman su supervivencia tras las inoculaciones, representando un claro riesgo (Portocarrero *et al.*, 2002) aunque los brotes asociados a este tipo de productos son escasos. En el caso de los embutidos cárnicos, este microorganismo ha sido aislado en embutidos fermentados, y el salami en concreto, ha sido identificado como producto con riesgo de producir listeriosis en Estados Unidos (Uterman y Müller, 1998).

El aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de embutidos fermentados ha llevado a la especulación de que otros patógenos, incluyendo *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli* productor de verocitotoxina, *Aeromonas spp.*, *Arcobacter spp.*, *Bacillus cereus* psicrotrofos, puedan también presentar un riesgo, aunque de momento son considerados como “rookies” o principiantes poco relevantes como agentes de toxiinfecciones alimentarias en productos cárnicos, sobre todo en carnes rojas y sus productos cárnicos derivados (Borch y Arinder, 2002).

El microorganismo que si está claramente reconocido como riesgo de intoxicación alimentaria en este tipo de productos es *Clostridium botulinum*, pues los brotes de botulismo asociados a productos cárnicos son sucesos documentados desde muy antiguo (Varnam y Sutherland, 1998), e incluso hubo una época en la que el botulismo estaba tan ligado a los embutidos que su nombre procede del de estos productos, *botulus* en latín significa embutido. En el caso de las salazones cárnicas, principalmente en las elaboraciones domiciliarias, el riesgo de botulismo es mayor, contribuyendo éstas notablemente a la incidencia del mismo.

En la tabla tres queda hecho un resumen de todas las bacterias patógenas asociadas a productos cárnicos que han sido nombradas en este apartado de la introducción.

Otro tipo de microorganismos que pueden ser vehiculados por los productos cárnicos son los virus, aunque en este caso la preocupación deriva más de la posible

transmisión, debido al comercio internacional, de virus patógenos animales a zonas donde estos están erradicados, aunque ya existen estudios que avalan la seguridad de los procesos industriales de elaboración de productos cárnicos como el jamón frente a este riesgo (Mebus *et al.*, 1996). Por lo que respecta a la transmisión de virus patógenos a humanos a través de productos cárnicos, se han realizado un número limitado de estudios de los que se deduce que, en general, son inactivados durante la maduración o la fermentación activa, aunque con notables diferencias entre los experimentos (Varnam y Sutherland, 1998). De otra manera, a causa de la contaminación por manipuladores de productos cárnicos ya elaborados si que hay brotes documentados, principalmente por Norovirus (Malek *et al.*, 2009). Por otro lado, hay teorías que señalan a algunos virus como el de la influenza aviar o el coxsackievirus como potenciales peligros en el futuro, incluso en los productos cárnicos (Sofos, 2008).

**Tabla 3. Principales bacterias patógenas aisladas en productos cárnicos.**

Microorganismo	Carne fresca	Productos cárnicos
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++
<i>Salmonella</i> spp.	++	++
<i>Listeria monocytogenes</i>	++	++
<i>Campylobacter</i> spp.	++	+
<i>Escherichia coli</i>	++	+
<i>Aeromonas</i> spp.		+
<i>Bacillus cereus</i>		+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	++	+
<i>Clostridium perfringens</i>	++	+
<i>Clostridium botulinum</i>	+	++

+: se especula que sean un posible riesgo; ++: aislado frecuentemente y/o implicado en brotes documentados

Por último, como otro más de los riesgos microbiológicos posibles en productos cárnicos está la presencia de hongos, ya que en ciertos tipos de embutidos pueden desarrollarse hongos micotoxigénicos, que suponen un peligro si se consumen pero cuyas micotoxinas no penetran en la masa (Varnam y Sutherland, 1998). Existen estudios realizados sobre este campo que demostraron que en casos concretos como el “biltong”, producto parecido a una cecina, se detectó que un hongo micotoxigénico como *Aspergillus glaucus* puede producir aflatoxinas, pero esta producción es tan lenta que el producto se alteraría antes por especies no patógenas (Van der Riet, 1976).

En consecuencia de todo lo anteriormente expuesto, dada la clara incidencia de algunos patógenos en este tipo de productos y adaptándose a las limitaciones propias de cualquier estudio, se decidió evaluar la presencia de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos elaborados en la comunidad autónoma de Castilla y León, y también profundizar más en el comportamiento de tres de ellos, *Staphylococcus aureus* por tratarse de un microorganismo muy frecuente, *Listeria monocytogenes* por su carácter emergente, y *Clostridium botulinum* por su peligrosidad y su relación con un brote acontecido en la región, sobre productos cárnicos envasados.

#### **4. Nuevas técnicas de detección molecular de microorganismos: PCR**

Los métodos tradicionales para la detección de microorganismos se basan, fundamentalmente, en técnicas de cultivo que realizan la detección en función de la respuesta fisiológica del microorganismo frente a distintos sustratos o agentes selectivos, como puede ser el crecimiento en determinado medio, la supervivencia y/o el crecimiento en presencia de agentes selectivos, la conversión de un sustrato en un producto detectable, etc. (Barbour y Tice, 2001). Estas respuestas fisiológicas de los agentes microbianos suelen depender de factores externos como el pH, el tipo y la cantidad de microbiota competidora o la temperatura, lo que identifica a los microorganismos por lo que hacen en un momento determinado, no por lo que realmente son (Anónimo, 2007).

Frente a estos sistemas tradicionales, en los últimos años, especialmente en las últimas dos décadas, se han ido desarrollando nuevos métodos de detección e identificación microbiana, basados esencialmente en técnicas inmunológicas y genéticas, muy fiables, específicas, sencillas y económicas (Barbour y Tice, 2001). Estas técnicas, aunque no requieran la medida de la respuesta fisiológica para la identificación, tampoco eliminan totalmente la necesidad de cultivar el microorganismo a detectar pues suele ser necesario, por lo menos, un enriquecimiento previo.

Dentro de estos modernos sistemas de identificación destacan especialmente los basados en técnicas genéticas, pues discriminan a los microorganismos mediante secuencias características de ADN o ARN. La gran ventaja de esta aproximación genotípica viene dada por la naturaleza esencialmente invariable de la secuencia genética, ya que los enfoques fenotípicos antes citados requieren la expresión de los genes, aspecto que depende de múltiples, y algunos todavía desconocidos, factores, mientras que con los métodos genéticos la presencia de los genes es característica suficiente para la identificación.

Por lo que se refiere al mecanismo íntimo de actuación de estos métodos genéticos, todos los utilizados para la detección de microorganismos se basan en la formación de un híbrido del ácido nucleico y las mayores diferencias entre ellos radican en las estrategias empleadas para detectar los híbridos. A modo de somera enumeración se presenta la siguiente clasificación de los distintos métodos genéticos de identificación:

- Hibridación estándar de sonda: la forma más sencilla en la que una sonda de ADN marcada se va hibridar específicamente con el ácido nucleico presente en la muestra (Baez y Juneja, 1995; Hyun-Joong *et al.*, 2008).
- Amplificación de la secuencia objeto: todos los métodos englobados en este apartado requieren la identificación de dos secuencias conservadas que se puedan usar para diseñar sondas de amplificación (cebadores o “primers”) cuyas secuencias deben ser exclusivas del organismo a detectar y estar conservadas, es decir, que sean invariables para ese grupo. Dichas secuencias son amplificadas y detectadas de distinta manera según el método utilizado, que puede ser la **PCR** (Saiki *et al.*, 1985), la SDA (Walker *et al.*, 1992; Christine, 2004) o NASBA (Compton, 1991; Cook *et al.*, 2004).
- Amplificación de la sonda: son aquellos métodos que amplifican únicamente la sonda o una parte de la misma utilizada en las reacciones de hibridación, a diferencia de la amplificación de las secuencias objeto. Dentro de este grupo destacan técnicas como la LCR (Wiedmann *et al.*, 1993; Khanna *et al.*, 1999) o la replicasa Q $\beta$  (Kramer y Lizairdi, 1989).
- Amplificación de la señal: en estos métodos se incrementa la sensibilidad de la hibridación facilitando la expresión de múltiples moléculas señal, lo cual se consigue mediante el uso de varias sondas. Como ejemplo representativo de este

sistema destaca la hibridación de ADN ramificado (Urdea *et al.*, 1991; Ross *et al.*, 2002) que ha conseguido un enorme incremento de la sensibilidad de estos sistemas ya que al unir varias sondas al mismo ADN objeto se forma un complejo más fácil de detectar.

De entre todas estas nuevas técnicas genéticas de detección destaca por su utilidad, versatilidad y facilidad de aplicación la PCR. La **PCR**, sigla procedente de los términos en inglés *Polymerase Chain Reaction*, es un método de amplificación *in vitro* de material genético. Se puede describir brevemente como una técnica que facilita la identificación precisa de fragmentos de ADN, o indirectamente de un ARN a través de su ADNc (ADN complementario), y los reproduce en millones de copias en cortos periodos de tiempo.

Esta técnica, como nueva herramienta de trabajo, ha supuesto una auténtica revolución en el mundo científico, teniendo especial trascendencia sobre todo en el campo de la biología molecular. Es tal su relevancia en la ciencia actual y tantas sus aplicaciones prácticas que se puede afirmar con rotundidad que ha transformado profundamente el modo de trabajar y el potencial de la biología molecular. Para Paul Rabinow, profesor de antropología en la Universidad californiana de Berkeley y escritor del libro "Making PCR. A store of Biotechnology" (1996), la PCR ha supuesto un invento biotecnológico histórico, sencillamente *haciendo abundante lo que antes era escaso*, es decir, el material genético. Pero además, la PCR es un método increíblemente versátil, en el que con regularidad se van produciendo nuevos contextos y nuevos usos, y que ha pasado, simultáneamente y en menos de una década, a ser un componente básico en cualquier laboratorio de biología molecular y, sin embargo, sigue siendo una herramienta que mejora constantemente cuyo desarrollo y aplicaciones parecen no haber encontrado techo todavía. El exponencial desarrollo de este nuevo procedimiento queda reflejado en la figura 6, gráfica que indica el incremento del número de publicaciones sobre la PCR en el periodo de tiempo comprendido entre 1985-2000.

**Figura 6. Gráfico de la evolución de los resultados de la búsqueda de artículos que contienen la palabra PCR en PubMed.**

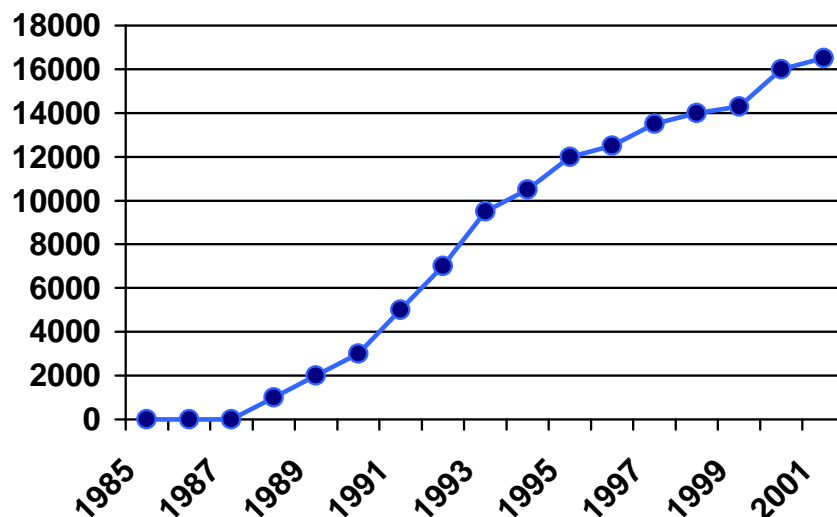


Gráfico que muestra el número de artículos/año que contienen las palabras Polymerase Chain Reaction en el buscado PubMed (Bartlett y Stirling, 2003).

El “**descubrimiento**” de la PCR como método de biología molecular se basa, como la mayoría de los avances que se producen en cualquier campo de la ciencia, en los estudios y publicaciones realizados previamente por otros investigadores. En el caso de la PCR, fue fundamental la base que supuso otro mítico avance científico del siglo XX: la descripción de la estructura de la doble hélice del ADN basada en los trabajos realizados por Watson, Crick (Watson y Crick, 1953), Wilkins y Franklin (Sayre, 1975, Wade, 1976). Igualmente fueron necesarias otras investigaciones como las realizadas sobre la replicación del ADN y la identificación de la ADN polimerasa por Kornberg (Lehman, 1953), y los experimentos y técnicas desarrolladas por Khorana para sintetizar ADN *in vitro* (Khorana *et al.*, 1976), todos ellos acontecidos sobre los años 50-60. También resultaron esenciales los nuevos métodos de secuenciación del ADN, en concreto el desarrollo de la determinación del orden de la secuencia de nucleótidos realizada por Sanger en 1975 (Sanger, 1977). Por otro lado y paralelamente, el aislamiento de la bacteria *Thermus aquaticus* en 1969, bacteria termofílica encontrada en aguas calientes del Parque Nacional de Yellowstone en Estados Unidos (Brock, 1969) y la purificación de su ADN polimerasa, capaz de mantener su actividad a temperaturas superiores a 75°C (Chien, 1976), fueron esenciales para el completo desarrollo de la técnica de PCR.



Continuando con los acontecimientos que contribuyeron al desarrollo de la PCR, es obligado indicar que ya fue descrita por primera vez como técnica en 1971 por el investigador noruego Kleppe (Kleppe *et al.*, 1971), quien al final de una publicación describía que el uso de dos cebadores serviría para la replicación de segmentos específicos de ADN, y otros autores (Fairchild, 2006) citan a Panet y Khorana como los primeros en describir el concepto de PCR (Panet y Khorana, 1974). Pero fue sin duda el científico estadounidense Kary Mullis, coganador del Premio Nobel de Química 1993 por este descubrimiento, quien, independientemente de posibles controversias, construyó el concepto o diseño de la técnica de PCR, aunque los componentes de la técnica, e incluso la propia técnica, ya existiesen (Mullis *et al.*, 1986; Mullis y Faloona, 1987). No fue hasta la “idea” de Mullis (Mullis, 1993) cuando se reunieron las habilidades necesarias para hacer factible la técnica, y ésta, en muy poco tiempo, fue perfeccionada por otros científicos de la Perkin Elmer-Cetus Corp. (Saiki, 1988, Stofflet, 1988, Bertrand *et al.*, 1989, Lawyer, 1993) gracias a la aplicación de la ADN polimerasa termoestable del microorganismo *Thermus aquaticus*, junto con el diseño de los termocicladores, aparatos que consisten en un bloque térmico programable para ser calentado y enfriado rápidamente (Wittbrodt y Ethardt, 1989), esenciales para la total automatización del proceso tal y como ahora lo conocemos.

**Figura 7. Kary Mullis, termociclador y *Thermus aquaticus*.**



Kary Mullis, Premio Nobel en 1993 por la invención de la PCR.



Termociclador (Mastercycler® gradient thermal cycler), aparato decisivo en la automatización de la PCR.



*Thermus aquaticus*, bacteria de la que se extrae la ADN polimerasa termoestable.

Por lo que se refiere a la descripción de **la técnica de PCR**, es un método enzimático, basado en la imitación de la replicación *in vivo* del ADN, que hace posible la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de ADN, o indirectamente desde ARN, en cortos periodos de tiempo. Para que el proceso completo sea llevado a cabo son necesarios los reactivos y etapas que a continuación van a ser descritos.

En lo relativo a los reactivos, por un lado están los primers o cebadores, componentes sensibles y determinantes en el éxito de los ensayos de PCR. Los cebadores son oligonucleótidos complementarios de los extremos 3' de ambas cadenas del fragmento de ADN diana que se quiere amplificar. Su longitud suele estar entre 18 y 30 nucleótidos y su contenido en G+C entre 40-75 % y habitualmente se emplean a concentraciones 0,1-0,5  $\mu\text{M}$  (Rodríguez y Barrera, 2004). Pueden ser específicos, de una secuencia única para una sola especie, o pueden ser universales, complementarios a una secuencia común a varias o todas las especies u organismos.

Los cebadores ideales deben carecer lo más posible de estructuras complementarias entre si, especialmente en los extremos 3', ya que esto induce a que los cebadores se traslapen y sirvan de muestra e iniciador entre si, originando pequeños amplicones que se denominan dímeros de cebadores. Estos dímeros se amplifican muy eficientemente, reduciendo la cantidad de cebadores disponibles para la reacción, provocando un menor rendimiento del amplicón de interés y produciendo reacciones inespecíficas que interfieren en la interpretación del resultado de la PCR (Brownie *et al.*, 1997).

Además, ambos iniciadores deben tener una temperatura de fusión o  $T_m$  similar y, por ende, un contenido semejante en G+C. La fórmula más utilizada para calcular la  $T_m$  de un iniciador es:  $T_m = (2^\circ\text{C} \times (\text{número de A+T})) + (4^\circ\text{C} \times (\text{número de G+C}))$

Otra serie de normas a tener en cuenta en el diseño de los primers son: que deben evitarse series de nucleótidos idénticos, especialmente 4 o más G's, y que el extremo 3' tenga una estructura secundaria importante, y también procurar, en la medida de lo posible, que las últimas bases del extremo sean G o C para que brinden mayor estabilidad al punto de inicio de la etapa de extensión (Henke *et al.*, 1997).

Actualmente existen varios programas informáticos para el diseño de cebadores, como los accesibles en las siguientes direcciones (Bernales, 2010):

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK\\_LOC=BalstHome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BalstHome)
- <http://frod.wi.mit.edu./primer3/>
- <http://eu.idtADN.com/scitools/applications/primerquest/default.aspx>
- <http://www. Roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp>

Otro de los componentes esenciales de la reacción son los nucleótidos o dNTPs (dATP, dTTP, dCTP y dGTP), los ladrillos con los que se construyen las nuevas cadenas de ADN que además aportan la energía necesaria para que se produzca la síntesis de la región de ADN a amplificar. La variación en su concentración afecta a la especificidad y la fidelidad de la reacción, ya que concentraciones altas de los mismos tienden a disminuir la fidelidad con la que la ADN polimerasa efectúa su trabajo, llegando incluso a inhibirla. También afecta a la fidelidad el uso de concentraciones no compensadas de las cuatro bases, usándose habitualmente a concentraciones 0.2 a 1 nM. Otro factor a tener en cuenta es el tamaño del amplicón a amplificar, pues a amplicones más grandes hay que utilizar una concentración mayor de dNTPs (Rodríguez y Barrera, 2004).

Siguiendo con los reactivos fundamentales en la reacción de PCR, la enzima ADN polimerasa es otro de los más importantes. El requisito esencial que debe cumplir es que tiene que ser capaz de resistir las altas temperaturas empleadas en la reacción, oscilando en torno a los 72°C la temperatura a la cual incorporan aproximadamente unos 100 nucleótidos por segundo. Dos enzimas de uso muy extendido son la ADN polimerasa *Taq*, proveniente de la bacteria *Thermus aquaticus* (Saiki, 1988) y la *Vent*, extraída de la bacteria *Thermococcus litoralis* (Cariello, 1991), siendo la primera la que se utiliza con más frecuencia.

La *Taq* polimerasa es una proteína que consta de una sola cadena polipeptídica con un peso molecular de unos 95 kDa, con actividad exonucleasa 5' → 3' (Longley *et al.*, 1990). Tiene un mayor porcentaje de error que otras enzimas, ya que no tiene actividad correctora 3' → 5', por lo que la fidelidad de sus replicaciones es menor, dependiendo ésta de la concentración del ión  $Mg^{+2}$  y de los dNTPs y del balance de concentración entre estos últimos. Sin embargo es menos exigente que otras enzimas a las condiciones de PCR, con menor probabilidad de fallos. En caso de requerir una

mayor fidelidad del copiado existen otras enzimas como la *Pfu*, extraída originariamente de *Pyrococcus furiosus* (Lundberg *et al.*, 1991) o *UITma*, proveniente de *Thermotoga maritima* (Diaz, 1998). También se dispone ya de enzimas con actividad reverso transcriptasa, que permite catalizar tanto la transcripción reversa como la propia PCR, como es el caso de la *rTth*, enzima extraída del *Thermus thermophilus* (Juhasz et al., 1996; Myers y Gelfand, 1991)

Por otro lado, hay una serie de aditivos que pueden resultar necesarios para llevar a cabo el proceso correctamente, como son:

- soluciones amortiguadoras que suelen incluir Tris-HCl (pH 8,4 a temperatura ambiente), KCl, gelatina y MgCl<sub>2</sub> para mantener la reacción a un pH adecuado
- adyuvantes como el dimetilsulfóxido que disminuye la estructura secundaria del ADN (Pomp y Medrano, 1991)
- detergentes como el tween 20 o el Tritón x-100 que ayudan a estabilizar la enzima
- glicerol puede proteger a la *Taq* contra daños por la temperatura
- seroalbúmina bovina puede mejorar la eficiencia de la reacción reduciendo el efecto de algunos inhibidores de la enzima

Mención a parte merece el magnesio, que tiene una función crítica en la reacción, requiriéndose a concentraciones que oscilan entre 0,5 y 2,5 mM para que la PCR se lleve a cabo. La cantidad a añadir del mismo debería ser optimizada en cada ensayo ya que tiene una gran influencia sobre la especificidad y el rendimiento de la reacción. Concentraciones insuficientes de magnesio darían lugar a un bajo rendimiento, mientras que usado en exceso se podrían obtener amplificaciones inespecíficas.

Todos los reactivos citados hasta el momento, a excepción de los cebadores, suelen comercializarse ya reunidos en una sola suspensión, lo que facilita y simplifica mucho el desarrollo de los protocolos rutinarios de PCR en el laboratorio, suponiendo un gran ahorro de tiempo. Se encuentran como “master mix format” y habitualmente contienen, en un único vial, la *Taq* ADN polimerasa, KCl, dNTPs, Tris-HCl, Mg y otros estabilizadores propios, generalmente registrados, de la casa comercial.

El solvente sobre el que se lleva a cabo la reacción es el agua, frecuentemente agua Milli-Q, purificada y desionizada, que para mayor seguridad en el desarrollo de la técnica, suele dejarse expuesta durante al menos 24 horas a radiación ultravioleta, lo que desnaturaría cualquier resto de ADN presente en la misma (Ou, 1991).

El último componente que es necesario añadir para que la reacción de PCR tenga lugar es la muestra, es decir, el ADN molde que queremos amplificar. Se puede partir desde cantidades muy pequeñas, incluso desde tan sólo 1 ng en el caso de material genético clonado o desde 20 ng cuando se utiliza ADN genómico proveniente de células eucariotas. Generalmente, la muestra debe ser preparada antes de ser sometida al termociclado, siendo suficiente un tratamiento térmico que rompa las células quedando y libere el ADN que, en general, no necesita ser purificado, ya que la técnica de PCR es bastante robusta. Sí se debería tener especial cuidado cuando se sospeche la presencia de inhibidores de la ADN polimerasa en la muestra a analizar como los que reducen la disponibilidad del magnesio o los interfieren en la unión del  $Mg^{2+}$  con la ADN polimerasa (Bessitti, 2007). Una lista de los inhibidores más habituales queda recogida en la tabla 4. Para disminuir el efecto de los inhibidores sobre la reacción de PCR pueden ser utilizados algunos de los aditivos antes descritos.

**Tabla 4. Algunos inhibidores identificados de PCR.**

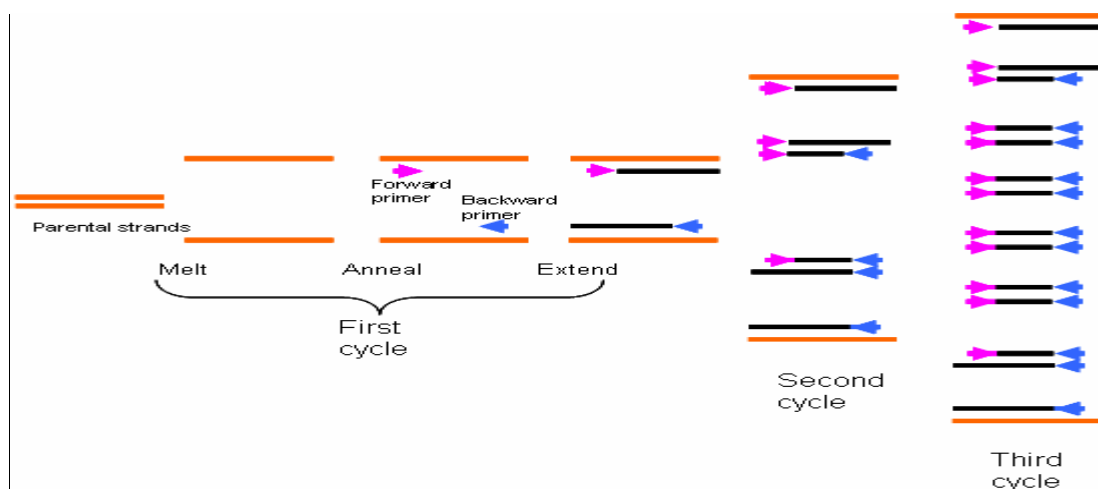
Inhibidores	Referencias
Sales biliares	Lantz <i>et al.</i> 1997
Polisacáridos complejos	Monteiro <i>et al.</i> 1997
Colágeno	Kim, 2001
Grupo hemo	Akane <i>et al.</i> 1994
Ácido húmico	Tsai & Olson, 1992; Watson & Blackwell, 2000
Melanina y eumelanina	Eckhart <i>et al.</i> 2000; Yoshii <i>et al.</i> 1993
Mioglobina	Belec <i>et al.</i> 1998
Polisacaridos	Demeke & Adams, 1992
Proteinasas	Bickley <i>et al.</i> 1996
Iones de calcio	Powell <i>et al.</i> 1994
Urea	Khan <i>et al.</i> 1991
Hemoglobina y lactoferrina	Al-Soud & Rådström, 2001
Inmunoglobulina G	Al-Soud <i>et al.</i> 1991
Azul índigo	Shutler <i>et al.</i> 1999

Fuente: Revisado por Rådström *et al.* en 2004.

Una vez descritos los reactivos habituales y la preparación de la muestra, el siguiente paso lo constituyen los pasos que componen la PCR. La reacción consta de tres etapas básicas, ver figura 6, que, generalmente, se repiten entre 30 y 40 veces o ciclos:

- Desnaturalización (*Melt*): consiste en la ruptura de los puentes de hidrógeno intercatenarios de la doble hélice del ADN, al exponer los reactivos a 95°C durante un corto periodo de tiempo, dependiendo del contenido en G+C, dando como resultado un ADN de cadena sencilla y paralizándose todas las reacciones enzimáticas, como la extensión después del ciclo anterior.
- Hibridación o anillamiento (*Anneal*): las cadenas desnaturalizadas del ADN molde se unen con el cebador a una temperatura que facilite el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias y que, generalmente, oscila entre 50-60°C. Un aumento de temperatura favorecere la especificidad, disminuyendo las uniones incorrectas.
- Elongación, extensión o polimerización (*Extend*): se efectúa a 72°C, que es la temperatura a la que la polimerasa extiende la longitud de los cebadores evitando alineamientos inespecíficos de los iniciadores, añadiendo los diferentes nucleótidos libres en el orden que le va dictando la cadena molde (Baumforth, 1999) por la unión la extremo 3' del cebador de los nucleótidos complementarios. La nueva cadena se sintetiza en dirección 5'→3'.

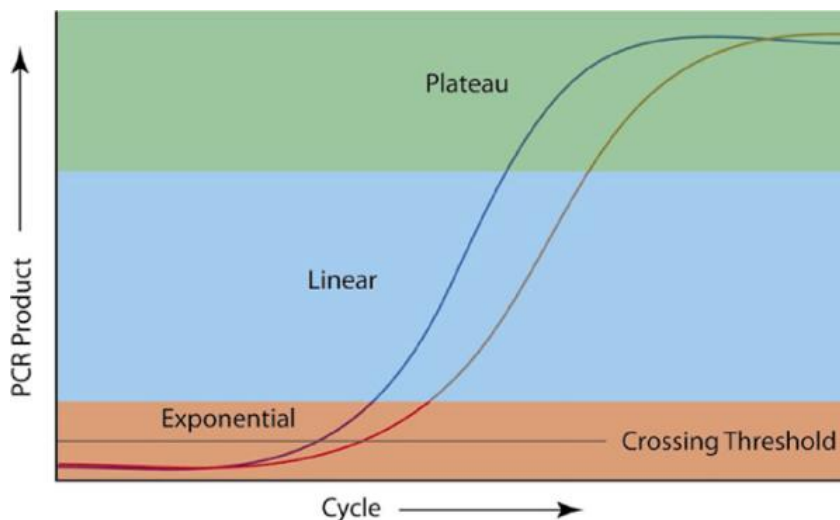
**Figura 8. Esquema de las etapas básicas de un proceso de PCR**



Parental strands: ADN molde; Forward and Backward primer: cebadores “hacia delante” y “hacia atrás”; Melt: desnaturalización; Anneal: hibridación; Extend: elongación. Fuente: [www.mylaboratorio.blogspot.com](http://www.mylaboratorio.blogspot.com)

Estas tres fases constituyen un ciclo completo de PCR, que dura alrededor de 2 a 3 minutos. El ciclo completo de tres pasos se puede repetir sin límite, pero la enzima, los primers y los nucleótidos suelen renovarse cada 30-35 ciclos, siendo suficientes para producir mil millones de copias de ADN. Teóricamente, el aumento del número de copias es exponencial, y si de una ADN molde se obtienen dos copias, en treinta ciclos tendríamos unos mil millones de copias. Pero en la práctica el proceso no es tan eficiente, ya que la enzima sufre un efecto meseta debido a una atenuación en la actividad por acumulación del producto, así que después de un número determinado de ciclos la amplificación deja de comportarse de manera exponencial, pasando por una fase lineal y llegando a una fase estacionaria. Este efecto se observa claramente en los gráficos, ver figura 7, obtenidos en la PCR a tiempo real, donde a la fase estacionaria se la denomina comúnmente fase “plateau” (Morrison y Gannon, 1994; Sainz, 2000).

**Figura 9. Fases del desarrollo de la PCR a tiempo real.**



PCR Product: cantidad de amplicones generados; Cycle: número de ciclos; Exponential: aumento exponencial del número de amplicones; Linear: etapa de aumento lineal; Plateau: fase plateau o estacionaria de la PCR; Thershold: umbral de detección que se debe establecer en la RT-PCR. Fuente: [www.biotechniques.com](http://www.biotechniques.com)

Una vez finalizados todos los ciclos, es conveniente añadir un último paso de extensión de entre 5 a 10 minutos a 72°C que complete la síntesis de moléculas que estén incompletas y así asegurar que todas las moléculas amplificadas tengan la misma extensión.

Tras completar la PCR el material genético amplificado resultante necesita de un procedimiento que permita su detección y/o cuantificación. En el procedimiento

tradicional manual se realiza una electroforesis que separa los amplicones resultantes en función de su peso molecular y posteriormente estos son detectados, y cuantificados cuando se dispone de los sistemas adecuados, utilizando diversos métodos entre los que destacan, por ser los más habituales, los tintes intercalantes fluorescentes como el bromuro de etidio, el SYBR<sup>®</sup>Green (Ririe *et al.*, 1997, Schneeberger *et al.*, 1995) y el más recientemente GelRed. Otros sistemas más modernos y automatizados de detección y más fácil cuantificación miden la radiactividad incorporada al material amplificado, utilizan sondas de hibridación específicas marcadas con fluorocromos o usan enzimas que producen fluorescencia (Hall *et al.*, 1998) o luminiscencia (Siddiqi *et al.*, 1996) habiendo sido desarrollados también otros métodos de detección mediante HPLC (Hayward-Lester *et al.*, 1998), la electroforesis capilar (Borson *et al.*, 1995) o sistemas mixtos que combinan PCR y ELISA (Metzger-Boddien, 2004).

La técnica clásica de PCR ha ido evolucionando, rápida y diversamente, y de ella han surgido numerosas variaciones como la PCR “hot start”, PCR “touchdown”, PCR asimétrica,... por citar sólo algunas. Aquí sólo van a ser brevemente descritas las que destacan tanto por las ventajas que suponen como por sus actuales aplicaciones:

- PCR anidada o Nested PCR: consiste en hacer una primera amplificación de un fragmento y usar el producto obtenido como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada, lo que permite obtener productos más fiables (Díaz, 2003; Olmos *et al.*, 2003).
- PCR múltiple o multiplex: es una reacción en la que se consiguen amplificar simultáneamente y en un único tubo diferentes secuencias diana, permitiendo la detección e identificación simultánea de distintos genes de interés. Consiste en combinar en una única reacción, junto con el resto de los reactivos, varios pares de cebadores que deben reunir un conjunto de premisas como: que no interaccionen entre si, que tengan temperaturas de anillamiento similares, que cada pareja amplíe una única secuencia diana y que generen amplicones de tamaño lo suficientemente diferente como para ser separados tras la amplificación. Resulta una técnica muy útil en la detección de deleciones, mutaciones y polimorfismos, pero resulta especialmente relevante en microbiología clínica siendo muy usada en la detección e identificación de patógenos junto con la diferenciación de sus genes de virulencia y/o resistencia con gran sensibilidad y rapidez (Méndez-Álvarez y Pérez-Roth,



2004). Por otro lado, también está la posibilidad de detectar varios patógenos en una misma muestra en una única PCR (Paniker *et al.*, 2004).

- PCR *in situ*: Es un proceso que combina el uso de la PCR con la hibridación *in situ* o ISH (*In Situ Hybridization*). La hibridación *in situ* es una técnica para la localización de determinados genes en el material genético celular. En ella una sonda marcada radiactivamente se pone en contacto durante varias horas con cromosomas cuya estructura permanezca intacta pero con su ADN desnaturalizado, ya sea en secciones histológicas o en células, realizándola sobre preparaciones fijas en portaobjetos. La hibridación de la sonda con el ADN nos permite localizar la secuencia deseada en los cromosomas con un alto nivel de especificidad, pero tiene el inconveniente de presentar un bajo nivel de detección o sensibilidad, pues sólo con la hibridación no se consigue detectar un bajo número de copias, menos de 20 copias por célula (Herrington *et al.*, 1992). El “matrimonio” de esta técnica con el procedimiento de PCR permite la detección de cantidades pequeñísimas de genoma, permitiendo la amplificación de secuencias específicas de material genético dentro de la propia célula e incrementando el número de copias de estas secuencias diana hasta niveles fácilmente detectables (Nuovo *et al.*, 1991b, Nuovo, 2003).
- RT-PCR: Reverse-Transcriptase PCR. Es una variante de la PCR que consiste en utilizar el ARN como sustrato de la reacción mediante la acción una enzima con actividad retrotranscriptasa que pueda convertir el ARN de cualquier tipo, ya sea ARN mensajero, de transferencia, ribosómico, mitocondrial, en ADNc (ADN complementario). Posteriormente, ya sea sobre una alícuota del ADNc obtenido (*one-step* RT-PCR) o añadiendo los reactivos necesarios sobre el mismo tubo (*two-step* RT-PCR) se lleva a cabo la amplificación mediante PCR clásica para la detección o cuantificación del ARN diana (Myers y Gelfand, 1991; Pfeffer, 1995; Stemme y Stemme, 2004).
- Q-PCR, PCR cuantitativa o Real Time PCR: es una variante de la PCR tradicional en la que el ADN es amplificado y cuantificado simultáneamente en la misma reacción, siendo llevada a cabo la cuantificación mediante la adición a la reacción clásica de un fluorocromo que emita fluorescencia al ser excitado a una determinada longitud de onda. Las variaciones en la emisión de fluorescencia, según el tipo de fluorocromo usado, es proporcional a la cantidad de ADN sintetizado (Saunders, 2009; Higuchi *et al.*, 1993). Para llevar a cabo este procedimiento es necesario

disponer de termocicladores especiales dotados de los sensores necesarios para medir las señales emitidas. La técnica de PCR cuantitativa se puede clasificar en dos grandes grupos en función del tipo de fluorocromo utilizado. Estos pueden ser específicos, en los cuales una sonda marcada con un emisor y diseñada particularmente para que reconozca el segmento intermedio del amplicón, las más habituales las TaqMan<sup>®</sup>, o ya en desuso las Scorpions<sup>™</sup> o las Molecular Beacons, es la que emite fluorescencia al ser activada por la propia ADN polimerasa. O inespecíficos, como el SYBR Green I que es un colorante universal que se une a cualquier surco de ADN y con el que al aumentar la temperatura y desnaturalizarse la hebra de ADN se produce una disminución en la intensidad de la señal que es lo que se mide (Bustin, 2004). La ventaja de los fluorocromos inespecíficos es la sencillez de su uso y menor coste, pero se unen a cualquier material genético con más probabilidad de dar falsos positivos, inconveniente que no tienen las sondas específicas pero cuyo diseño es mucho más complicado pues hay que tener en cuenta muchos factores como su T<sub>m</sub>, el número de pares de bases, evitar series de nucleótidos idénticas o evitar 3 residuos G en el extremo 3' entre otros (Bernal, 2010). El uso más extendido de esta variante es sin duda el análisis de la expresión génica mediante Q-RT-PCR, aunque ya tiene numerosas aplicaciones industriales como la detección de los OMGs y la cuantificación de la carga microbiana en alimentos como el Sistema BAX<sup>®</sup>.

Respecto a **las aplicaciones de la PCR**, éstas son múltiples y todavía tienen por delante un gran potencial, abarcando multitud campos desde su utilidad en ciencias médicas en el diagnóstico de enfermedades genéticas o infecciosas y en el diagnóstico prenatal, campo donde se siguen desarrollando los mayores avances, su muy conocido uso en medicina forense y tests de paternidad, el desarrollo de árboles filogenéticos, donde han dado origen a una nueva rama, la paleontología molecular, y el análisis de la expresión génica entre otras.

Especial interés para la presente tesis tiene el empleo de la PCR en la industria agroalimentaria, en donde se han ido desarrollando numerosas aplicaciones de la misma como son la obtención de secuencias genéticas modificadas útiles en ingeniería genética, la identificación de la especie de procedencia, animal o vegetal, en la composición de piensos y alimentos, la detección de organismos genéticamente

modificados, plagas y parásitos (Rodríguez y Barrera, 2004), detección y cuantificación de cultivos iniciadores (Fujiwara *et al.*, 2001) o la identificación a nivel de especie de cepas de interés, donde se ha revelado como una técnica rápida, específica y eficiente (Aymerich *et al.*, 2003).

Dentro de esta industria mención aparte merece el uso de la PCR como método para la detección y/o cuantificación de patógenos de transmisión alimentaria, aplicación para la que ha sido utilizada en este trabajo de investigación, ya que frente a los procedimientos tradicionales de detección de agentes patógenos en alimentos, basados fundamentalmente en técnicas de enriquecimiento y aislamiento del microorganismo seguidas de una identificación bioquímica o serológica (Malorny *et al.*, 2003; Fairchild *et al.*, 2006), las nuevas técnicas genéticas de detección molecular como la PCR han supuesto un gran avance al ser generalmente más rápidas, económicas y relativamente sencillas (Barbour y Tice, 2001; Aymerich *et al.*, 2004).

Concretamente, la característica y ventaja esencial que distingue a la PCR en particular, y a otros métodos de detección molecular en general, es el no requerir actividad celular del microorganismo ya que, a diferencia de los métodos tradicionales, no se basa en la respuesta fisiológica del mismo frente a distintos sustratos o agentes selectivos, evitando así la dependencia o interferencia de otros factores como la temperatura, el pH o la microbiota competidora. En otras palabras, la base de la identificación no está en la expresión de las propiedades fenotípicas propias de la actividad celular, que pueden expresarse o no y además son relativamente difíciles de interpretar o clasificar, pues mediante la PCR sólo es necesaria la presencia del material genético, no su expresión. Además, la identificación de los genes asociados a un fenotipo resulta un excelente marcador no sólo detectar presencias microbianas, si no también para distinguir a los microorganismos patógenos de otros parecidos o cercanos que habitan el mismo nicho, aumentando mucho la especificidad de los métodos de identificación (Fairchild *et al.*, 2006).

Otra ventaja de la PCR respecto a los métodos tradicionales es que es una herramienta muy útil en la detección de aquellos microorganismos en estado viable pero no cultivable *in vitro* como sucede con algunos microorganismos como *Campylobacter* spp. (Tholozan *et al.*, 1999; Debruyne *et al.*, 2008) o *Vibrio*

*parahaemolyticus* (Courtard *et al.*, 2005). Por otro lado, en la superioridad de esta técnica respecto a otras destaca la propia naturaleza del ADN como material diana, debido a que su secuencia esencialmente invariable permite una identificación más fiable y específica, y su estabilidad, capaz de soportar mejor procesos físicos y químicos de extracción a partir de las muestras a analizar, mejora la sensibilidad de la misma frente a otros métodos de detección como los que utilizan proteínas.

En resumen, entre las ventajas más importantes de la PCR en la detección de patógenos de transmisión alimentaria respecto a métodos clásicos destacan la rapidez, buen nivel de detección, selectividad, especificidad, sensibilidad y potencial para la automatización (Malorny *et al.*, 2003).

Por otro lado la técnica de PCR también presenta algunos inconvenientes, como la gran influencia de las prácticas de trabajo del operario en los resultados cuando la técnica no está mecanizada, pues los errores son fácilmente cometidos al trabajar con volúmenes muy pequeños y con reactivos altamente sensibles. Concretamente, como técnica de uso general en microbiología de alimentos presenta también inconvenientes más específicos, siendo uno de ellos que de momento no se haya eliminado totalmente la necesidad de cultivar y/o enriquecer el microorganismo a detectar para llegar al umbral de detección de la PCR, que está en la práctica entre  $10^3$ - $10^4$  células por mililitro (Malorny *et al.*, 2003). Otro de las desventajas de la PCR como método de detección es la gran variabilidad de matrices alimentarias objeto de análisis, lo que implica un elevado número de potenciales inhibidores de la reacción (Aymerich *et al.*, 2004). Además, la PCR tradicional no distingue entre células viables y células muertas, lo que puede conducir a la aparición de falsos positivos en los resultados (Malorny *et al.*, 2003), aunque en la práctica casi todos los ensayos requieren un preenriquecimiento donde, obviamente, sólo se multiplican las células vivas y además la concentración de células muertas debería ser muy elevada (aproximadamente  $10^5$  células por gramo) para interferir en la detección (Barbour y Tice, 2001). Finalmente, está el inconveniente de que en los alimentos contaminados con toxinas preformadas, la presencia del microorganismo productor no es el mejor indicador de la existencia de un peligro (Barbour y Tice, 2001).

Concretamente, respecto a *Clostridium botulinum*, convencionalmente se realiza la detección de la toxina en el alimento mediante la inyección en ratones de muestras previamente preparadas comprobando su presencia por letalidad (Solomon y Lilly, 2001), técnica laboriosa, larga y comprometida éticamente. Actualmente, la técnica de PCR para la detección del gen de la toxina botulínica ha demostrado ser un método sensible, rápido y más barato (Szabo *et al.*, 1994) mediante la amplificación de la secuencia del ADN para la elaboración de toxina gracias al desarrollo de cebadores específicos. Este ADN amplificado es comparado, mediante su revelado tras una separación por electroforesis, con patrones conocidos que permiten detectar la presencia del microorganismo en el alimento, así como a qué grupo pertenece (Hielm, 1996). Sin embargo, todavía tiene el inconveniente de que detecta la presencia del microorganismo, no de su toxina, existiendo el riesgo de que una muestra contenga la toxina y que no se haya podido recuperar el microorganismo que la produjo. Por lo tanto, la prueba de bioensayo en ratón sigue siendo el método reconocido universalmente, sobre todo en caso de intoxicaciones alimentarias, para poder detectar la presencia de toxina y valorar, mediante la dosis letal 50, en qué cantidad se encuentra.

Todos los estudios concluyen, en cuanto a las aplicaciones, ventajas e inconvenientes del uso de la PCR como método de detección y/o cuantificación de microorganismos patógenos en alimentos, que el potencial de esta técnica en este campo es enorme y que su integración en los métodos convencionales aumentará el poder de resolución de los mismos, agilizará el tiempo dedicado a los análisis y mejorará cualitativamente la microbiología de alimentos (Malorny *et al.*, 2003; Aymerich *et al.*, 2004). Y que el camino hacia la aplicación de la PCR como método rutinario de diagnóstico pasa por una necesaria armonización, estandarización y validación del procedimiento, aspectos todavía en desarrollo (Malorny *et al.*, 2003). Actualmente varias organizaciones de validación acreditadas tales como AOAC (Association of Official Analytical Chemist) y Nordval han certificado en los últimos años métodos de detección de patógenos alimentarios mediante PCR a tiempo real como el BAX system de Dupont o el Lightcycler de Roche (Aymerich *et al.*, 2004). Finalmente, para el grupo de trabajo de la CEN (Comité Europeo de Normalización) en PCR TC275/WG6/TAG3 opinaba, en 2004, que la técnica podrá ser usada a nivel diagnóstico en el año 2010 con el mismo estatus que los medios de cultivo tradicionales.

## 5. Una herramienta para conocer la vida útil y los riesgos microbiológicos de los alimentos: *Challenge Test*

***Microbiological Challenge Test, Microbiological Challenge Testing, Challenge study*** o **Procedimiento de Validación Normalizado** (en adelante CT). Los CT constituyen un tipo de ensayo ampliamente aceptado y establecido en la industria alimentaria cuyo objetivo es simular que puede pasar en un producto durante el procesado, la distribución y su uso final, tras la inoculación de un microorganismo relevante en una cantidad también relevante (Notermans y Veld, 1994). Los estudios de CT han sido, y continúan siendo, una herramienta muy útil en la determinación de la capacidad que tiene un determinado alimento de soportar el crecimiento de microorganismos alterantes o patógenos (FDA/CFSAN, 2001). Constituyen un tipo de ensayo muy usado con diferentes fines como la validación de procesos tecnológicos diseñados para conseguir un cierto grado de letalidad contra un microorganismo diana o un grupo diana de microorganismos, la validación de la formulación de un producto en términos de factores de control intrínseco como el pH o la  $a_w$  y de variaciones en la misma, el conocimiento de la vida útil de un alimento o del cumplimiento de los criterios de seguridad alimentaria durante toda la vida útil e incluso después de finalizada esta (FSIS, 2008).

Concretamente un CT es un procedimiento en el cual es inoculada una dosis conocida de un microorganismo, ya sea alterante o patógeno, en un alimento concreto para determinar, si a lo largo del tiempo y en diferentes condiciones controladas de almacenamiento, este microorganismo puede constituir un peligro potencial tanto para la seguridad y/o el deterioro del producto. Habitualmente, los CTs son llevados a cabo para conocer el desarrollo potencial de microorganismos peligrosos que en condiciones normales están presentes en bajo número o de manera accidental (Notermans y Veld, 1994).

Se suele distinguir entre dos tipos de CT: de proceso o de producto. Los CT de proceso son usados para excluir el potencial riesgo de la supervivencia de un patógeno a un determinado tratamiento, mientras que los CT de producto van dirigidos a evaluar

si el microorganismo inoculado puede crecer o no y hasta que punto este crecimiento alcanza niveles inaceptables en un producto específico.

Para correcto desarrollo de un CT y para la obtención de resultados sólidos y fiables deberían ser tenidos en cuenta los siguientes factores (Vestergaard, 2001):

1. Selección apropiada del patógeno o “surrogate microorganism” (el microorganismo no patógeno más parecido a aquel objetivo de estudio) a inocular. Para establecer correctamente este punto es necesario un buen conocimiento de la formulación del alimento y, principalmente, de su historial sanitario y epidemiológico, de su asociación con determinados brotes alimentarios o la evidencia del potencial crecimiento del microorganismo en el mismo. Un clásico ejemplo de elección es el estudio de la posibilidad del crecimiento de *Clostridium botulinum* en ciertos envasados en atmósferas modificadas (FDA, 2001). El procedimiento ideal implicaría trabajar con varias cepas del mismo microorganismo, preferentemente aisladas de brotes o de análisis rutinarios del alimentos, para valorar las posibles variaciones en los resultados debidas a la cepa, pero ensayos con una sola cepa cuyas características estén bien definidas puede resultar útiles en productos muy estudiados. Por otro lado, algunas veces la cepa debería ser incubada y preparada en unas condiciones que impliquen una cierta adaptación previa a la formulación del producto antes de la inoculación. Por último, en circunstancias donde, generalmente por motivos de seguridad del personal, no sea posible trabajar con un patógeno concreto el uso de “surrogate microorganism” sería deseable. El “apatógeno” ideal sería una cepa del microorganismo diana que conserve todas las características del mismo salvo su virulencia, aunque, en la práctica, muchos “apatógenos” están íntimamente relacionados con el microorganismo diana y no son necesariamente la misma especie. Como ejemplo tradicional de este caso está el uso de *Clostridium sporogenes* como el más próximo a *Clostridium botulinum* en estudios de inoculación de envasados (FDA, 2001). Generalmente, los “surrogate microorganism” son seleccionados de un grupo bien caracterizado de organismos que deberían reunir los siguientes y deseables atributos (IFT, 2000): no patógeno, con características de inactivación y comportamiento similares al microorganismo diana, con características de crecimiento consistentes y estables, fácil de preparar en elevadas

concentraciones, con una población estable hasta su utilización una vez preparado, fácil de enumerar mediante sistemas de detección rápidos y económicos, fácil de distinguir de la microbiota acompañante, genéticamente estable para que los resultados puedan ser reproducibles en cualquier laboratorio o tiempo y que no cause contaminación ambiental del área de trabajo ni sea susceptible de volverse patógeno.

2. Cantidad de inóculo. La cantidad de inóculo depende básicamente del objetivo del estudio, ya sea éste determinar la estabilidad o vida útil de un producto o validar el efecto de un tratamiento como los que de calentamiento o altas presiones, objetivo para el cual suelen ser usados niveles de inoculación elevados. Otros factores también deben ser tenidos en cuenta como los recuentos obtenidos en muestreos previos del mismo producto o contaminación esperada del mismo, el riesgo de recontaminación o las especificaciones microbiológicas, si las hay, para ese producto. Por otro lado la cantidad de inóculo, para que el estudio sea desarrollado correctamente y no lleve a conclusiones erróneas, no debe ser ni demasiado baja, pues se podría llegar a asumir que el producto es estable cuando no lo es, ni demasiado alta pues esto nos llevaría a la conclusión contraria, que el producto no estable cuando si lo es.
3. Preparación del inóculo y método de inoculación. La preparación del inóculo que va a ser usado en un CT es un componente muy importante del protocolo. Las células vegetativas habitualmente deberían ser recuperadas de caldos de cultivos o slants refrigerados o de suspensiones congeladas con glicerol y, aunque lo más frecuente sea hacer crecer al microorganismo en condiciones óptimas, a veces, una adaptación del microorganismo al tipo de alimento en que va a ser inoculado puede ser necesaria. Por otro lado el recuento del número de células vegetativas o esporas de la suspensión siempre deben ser llevados a cabo para conocer la cantidad exacta de inóculo. El método de inoculación es otro punto extremadamente importante cuando se lleva a cabo un CT y todos los esfuerzos deberían estar dirigidos a no cambiar parámetros del producto que modifiquen los resultados al crear nuevas condiciones para el microorganismo, distintas de las habituales del alimento. La elección del método de inoculación depende principalmente del tipo de alimento objetivo del estudio, especialmente de que se trate de una matriz líquida o sólida, pero el aspecto más importante a tener en cuenta en cualquier caso es la utilización de la menor cantidad posible



4. La duración del estudio. En este punto lo más prudente sería llevar a cabo el CT por lo menos hasta el final de la vida útil calculada para el producto, incluso con un margen de tiempo más allá de la misma, pues sería importante para determinar que pasaría cuando el consumidor decide mantenerlo y consumirlo ya caducado. Otro aspecto a tener en cuenta para mantener el estudio más allá de la vida útil es la posibilidad de valorar la recuperación de células subletalmente dañadas durante la inoculación, lo que lo ha sido observado en algunos productos. Estos daños subletales conducen a periodos de latencia en los cuales el microorganismo no puede ser recuperado, pero tiempo después un pequeño número de células se recuperan y crecen en el producto. Este efecto rebote o “fenómeno Phoenix” ha sido recogido por la literatura científica (Jay, 1996).
5. Formulación del producto a inocular y condiciones de almacenamiento. Antes de empezar el estudio es importante fijar el conocimiento de los rangos de aquellos parámetros que controlan la estabilidad del alimento. El efecto de factores como el pH, la  $a_w$  o el uso de algunos conservantes deberían ser valorados, no sólo en su valor medio, sino también en los extremos del rango (ej: para un pH de  $4,8 \pm 0,2$  habitual en el producto deberían ser estudiado los efectos sobre el microorganismo de los extremos del rango como 4 y 5). Por otro lado, las condiciones de almacenamiento deberían ser lo más parecidas, dentro de lo posible, a las reales. El alimento debería ser almacenado en el mismo tipo de envase que se usa comercialmente y en las mismas condiciones, y la temperatura usada en el CT debería incluir los rangos típicos de almacenamiento a los que se ve sometido el alimento durante su vida comercial, como por ejemplo, los posibles abusos de temperatura (Notermans *et al.*, 1994).
6. El análisis microbiológico de las muestras. La frecuencia de muestreo microbiológico dependerá básicamente de la duración del CT. Es deseable por lo menos incluir un mínimo de 5 a 7 puntos de muestreo a lo largo de toda la vida útil del producto para disponer de una buena información del comportamiento del inóculo, siendo la frecuencia del análisis de muestras proporcional a la duración del mismo (cada día si es una semana, una vez al mes en periodos de tiempo mayores) y variable según éste discurre, es decir, más frecuente al principio del

mismo y reduciéndose a medida que pasa el tiempo. Por otro lado, todos los estudios deberían empezar con un análisis a “tiempo cero”, justo después de la inoculación del producto. Los niveles de microorganismo en el producto deberían ser valorados en cada punto de muestreo y, usualmente, debería disponerse de al menos un duplicado de cada muestra en cada uno, además de una muestra control. Otros aspectos importantes que deberían ser tenidos en cuenta son: la elección del método de enumeración en función del tipo de microorganismo, el uso de medio selectivos o no, la valoración de la producción de toxina y la medición de determinados parámetros físico-químicos cuya modificación durante el desarrollo del CT tenga influencia sobre el comportamiento del patógeno.

7. Interpretación de los datos. Una vez completado el CT los datos deben ser analizados para conocer el comportamiento del microorganismo a lo largo del tiempo. Una interpretación estadística de los datos obtenidos nos permitiría validar si un proceso cumple con los niveles requeridos de letalidad, desarrollar o validar modelos de microbiología predictiva ya existentes o informarnos de la seguridad o estabilidad del producto inoculado.

Los CTs son por tanto herramientas prácticas, fiables y útiles en el análisis de los peligros microbiológicos potenciales que puedan presentarse en un alimento y serán utilizados en el desarrollo de los estudios de inoculación presentados en este trabajo de investigación.



**JUSTIFICACIÓN,  
PLANTEAMIENTO  
Y OBJETIVOS**



## **JUSTIFICACIÓN, PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS**

La Industria Cárnica es un sector productivo clave dentro de la Industria Alimentaria de Castilla y León, pues genera un elevado número de puestos de trabajo además de arrastrar positivamente otros sectores tradicionalmente más deprimidos como la producción agraria primaria, contribuyendo positivamente a la estabilidad de la economía en la comunidad autónoma. Y de entre todos los factores que contribuyen al buen desarrollo y mantenimiento de éste sector económico el aspecto más importante que debe ser tenido en cuenta es la elaboración de productos de calidad, seguros y competitivos.

Por otro lado, la innovación es un aspecto esencial para evitar el estancamiento económico, y el sector cárnico, por otro lado bastante tradicional, ha tenido que ir adaptándose a las nuevas demandas del mercado, innovando en sus productos y formas de presentación para satisfacer a un consumidor que, cada vez más, busca productos “de conveniencia”, de fácil y rápido consumo. El uso de nuevos sistemas de envasado en productos cárnicos es una realidad cuya aplicación tecnológica, frecuentemente, ha ido por delante de los conocimientos científicos sobre las posibles repercusiones sanitarias del uso de los mismos.

Además, uno de los objetivos fundamentales de cualquier gobierno, y en este caso concreto de la comunidad autónoma de Castilla y León, es lograr un nivel elevado de protección de la salud pública, lo que pasa necesariamente por la producción y distribución de alimentos con garantías sanitarias. Por otro lado, las repercusiones de brotes alimentarios asociados a productos cárnicos sobre la economía regional constituyen también un aspecto muy importante a tener en cuenta por las autoridades económicas.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos y con la doble finalidad de apoyar en a la Industria Cárnica en la implantación de sistemas APPCC y de facilitar a las autoridades sanitarias la planificación de los controles oficiales en función de los riesgos sanitarios, fue desarrollado un convenio de colaboración entre la Junta de Castilla y León y el ICTAL para realizar investigaciones de riesgos microbiológicos

relacionados con productos cárnicos de especial relevancia en Castilla y León, convenio bajo el cual se enmarca la presente Tesis Doctoral.

En el planteamiento inicial la Tesis estaba orientada hacia el estudio de *Clostridium botulinum* en productos cárnicos, pues el brote de botulismo que afectó a dos personas en Vigo en 2005 en el que el producto implicado era una pieza de cecina producida en Castilla y León fue uno de los elementos detonantes del Convenio. Más sin el estudio de la presencia de otros patógenos en este tipo de productos la presente Tesis Doctoral no estaría completa, por lo que, además de un análisis de la calidad microbiológica general de los productos cárnicos elaborados en Castilla y León, fue incluido el estudio del comportamiento y la evolución de otros dos patógenos, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, además de *Clostridium botulinum*, al ser inoculados en distintos productos cárnicos envasados en diferentes atmósferas protectoras, considerando posteriormente conveniente incluir el conocimiento de la evolución de *Clostridium botulinum* durante la elaboración de distintas piezas de cecina.

Otro hecho influyente para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral era la necesidad de la implantación en el ICTAL nuevas y modernas técnicas de identificación microbiana y, especialmente, de Biología Molecular, por lo que se fue considerada necesaria la inclusión en este estudio de la detección de *Clostridium botulinum* y de su apatógeno *Clostridium sporogenes* mediante la innovadora técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa o en sus siglas en inglés PCR.

En el contexto planteado y teniendo como **objetivo final** la obtención de información que pueda ser útil a las Autoridades Sanitarias y a la Industria Cárnica, los **objetivos generales** de la presente Tesis Doctoral se pueden resumir en tres.

Primero, evaluar mediante muestreo la calidad microbiológica de los productos cárnicos elaborados y distribuidos en la comunidad autónoma de Castilla y León.

Segundo, conocer el comportamiento de tres patógenos de transmisión alimentaria en productos cárnicos envasados en diferentes atmósferas protectoras.

Tercero, comprender la evolución de *Clostridium botulinum*, mediante el estudio de su apatógeno *Clostridium sporogenes*, durante la elaboración de la cecina.

Siendo más precisos, los **objetivos concretos** planteados fueron los siguientes:

- 1- Conocer la calidad microbiológica general de los siguientes productos cárnicos elaborados y distribuidos en Castilla y León: cecina, jamón, lomo, chorizo y salchichón, mediante el análisis microbiológico y molecular de los principales grupos microbianos indicadores y patógenos.
- 2- Conocer los valores medios de los principales parámetros físico-químicos, pH,  $a_w$  y contenido en sal y nitratos/nitritos, para cada tipo de producto de los señalados en el objetivo 1 y valorar su posible relación con la calidad microbiológica.
- 3- Estudiar la evolución de tres importantes patógenos involucrados en intoxicaciones y toxiinfecciones alimentarias: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*, al ser inoculados en tres productos cárnicos diferentes: jamón, cecina y chorizo, envasados en dos atmósferas protectoras distintas: vacío y modificada, y mantenidos a tres temperaturas distintas: 3, 11 y 20 °C.
- 4- Estudiar la evolución de *Clostridium botulinum*, mediante su apatógeno *Clostridium sporogenes*, durante todo el proceso de elaboración de la cecina desde su inoculación en la materia prima fresca.
- 5- Implantar la técnica de PCR en el ICTAL y desarrollarla para el estudio de la evolución de *Clostridium sporogenes* en los productos inoculados y evaluar su posible utilidad práctica como método de detección y/o identificación comparándola con técnicas tradicionales.





# **CAPÍTULO I**

**Evaluación de la calidad de  
productos cárnicos  
elaborados y comercializados en Castilla y León**



## I.1. Introducción

La industria cárnica regional es un factor productivo básico en la economía de la comunidad autónoma de Castilla y León. Por esta razón, el estudio de la calidad de los productos cárnicos que elabora, constituye un tema de interés y actualidad, tanto para la administración autonómica como para los propios empresarios de la industria cárnica, debido a su trascendencia económica y también sobre la imagen de calidad de los alimentos producidos en este territorio.

De todos los atributos relevantes de la calidad de los alimentos es la **calidad microbiológica** de los mismos, tanto desde el punto de vista sanitario, presencia de microorganismos patógenos, como higiénico, por la presencia de microorganismos alterantes, el parámetro de mayor importancia en relación a la protección de la salud del consumidor y/o la prevención de fraudes comerciales.

Los alimentos con buena calidad microbiológica nos aseguran que son sanos y de una vida útil más larga. Por lo tanto, la valoración de la calidad microbiológica de los alimentos desde el punto de vista técnico presenta algunas dificultades, dado que para determinados agentes causantes de enfermedades de transmisión alimentaria aún no se dispone de técnicas fiables, rápidas y económicas, al alcance de la mayor parte de la industria alimentaria, que permitan poner de manifiesto su presencia en los alimentos, especialmente cuando los agentes patógenos están en bajo número o se encuentran distribuidos de un modo desigual, además del hecho de que los alimentos generalmente contienen un gran número de microorganismos saprofitos que interfieren en la detección. Tales dificultades han determinado la amplia utilización de grupos, o especies, de microorganismos cuya enumeración o recuento se realiza con mayor facilidad y cuya ausencia o presencia en los alimentos ayuda a valorar la calidad higiénica de los mismos, indicando si estos productos estuvieron expuestos a condiciones que pudieran haber introducido microorganismos peligrosos y/o permitido la multiplicación de especies infecciosas o toxigénicas. Tales microorganismos se denominan habitualmente como *microorganismos indicadores*, definidos como aquellos cuya presencia en los alimentos señala un procesado inadecuado de los alimentos desde el punto de vista de la seguridad (Busta *et al.*, 2003).

Dentro de los grupos microbianos más utilizados para la valoración de la calidad higiénica de los procesos de elaboración y manipulación de los alimentos, entre ellos los productos cárnicos, destaca el recuento de la **microbiota aerobia mesófila viable**. Este es el grupo microbiano más utilizado como referencia de la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos (ICMSF, 2000), pues su presencia en niveles elevados suele indicar un inadecuado procesamiento del alimento además de estar asociada a una rápida alteración del producto, aunque por sí misma no suponga un riesgo potencial para la salud (Capita *et al.*, 1999) ni se pueda relacionar íntimamente un alto recuento con la posible presencia de patógenos (Pascual, 1989).

La técnica de valoración del número de bacterias mesófilas viables presentes en un alimento se basan comúnmente en el recuento del número de colonias que se desarrollan en agar nutritivo que previamente han sido sembradas con cantidades conocidas del alimento diluido y homogeneizado, e incubadas en condiciones de temperatura y tiempo determinados.

Para la mayoría de los alimentos de elaboración industrial, salvo excepciones como los fermentados, debería ser considerado como inadecuado su consumo cuando contienen un elevado número de microorganismos aerobios mesófilos viables, aún cuando estos no sean reconocidos como patógenos y no hayan alterado de forma apreciable los caracteres organolépticos del alimento. Las razones que justifican esta decisión son varias, destacando entre ellas las siguientes:

- la presencia de un elevado número de bacterias aerobias mesófilas que crecen bien a temperatura corporal o próxima a ella significa que pueden haberse dado las condiciones favorables para la multiplicación de otros microorganismos patógenos
- algunas cepas de bacterias mesófilas comunes, no consideradas generalmente como agentes de enfermedades transmitidas por los alimentos, como por ejemplo *Proteus* spp. (ICMSF, 2000), han sido señaladas como causa de enfermedad cuando estaban presentes en elevado número en un alimento, aunque hay que matizar que los datos relativos a la patogenicidad de las mismas son conflictivos
- la mayoría de las bacterias patógenas conocidas vehiculadas por los alimentos son mesófilas y en algunos casos contribuyen con su presencia a los recuentos en placa encontrados

- cuando la alteración de los alimentos es debida al crecimiento de microorganismos, que es la causa más frecuente de alteración, debe esperarse recuentos elevados en los productos alterados.

Por todo ello, las bacterias aerobias mesófilas pueden ser consideradas, generalmente, como buenos microorganismos indicadores, aunque es preciso advertir que también tienen un valor limitado en algunos casos como en alimentos donde por la fermentación o maduración un recuento elevado tiene un significado menos estricto, o como herramienta para predecir la vida útil de alimentos conservados a refrigeración, ya que muchos microorganismos mesófilos no crecen a temperaturas por debajo de los 5°C (Michener y Elliott, 1964), para lo que sí resulta útil realizar el recuento de la microbiota psicrotrofa.

La evaluación de la **microbiota psicrotrofa** constituye también un excelente indicador de la calidad higiénica del producto, especialmente cuando éste es conservado a refrigeración pues su número aumenta durante el almacenamiento, lo que no ocurre con otros microorganismos. Además, algunos de ellos pueden causar importantes modificaciones organolépticas si alcanzan elevadas concentraciones de entre  $10^6$  y  $10^8$  ufc/g (ICMSF, 2000).

El recuento de las bacterias psicrotrofas es llevado a cabo generalmente, al igual que con la microbiota mesófila, sobre las colonias que hayan crecido en agar nutritivo durante varios días a una temperatura de incubación de entre 5 y 10°C. Y como también ocurre con el grupo anterior, recuentos elevados suelen indicar una inadecuada manipulación del producto.

Otro grupo tradicionalmente utilizado como indicador de la calidad microbiológica de los productos alimenticios lo comprenden aquellos microorganismos que habitualmente viven en el tracto gastrointestinal humano y animal, las **bacterias indicadoras de contaminación fecal**, cuya presencia en un alimento indica contaminación de procedencia intestinal. Este grupo está constituido, entre otros miembros, por la familia *Enterobacteriaceae*, los coliformes y *Escherichia coli*.

***Escherichia coli*** es un microorganismo gram-negativo, anaerobio facultativo, móvil por flagelos peritricos y ++-- a la prueba IMViC. Se trata de una bacteria cuyo hábitat natural es el tracto entérico del hombre y los animales, por lo tanto, su presencia

en un alimento, generalmente, implica la contaminación directa o indirecta de origen fecal del mismo, siendo valorado como un indicador clásico de la posible presencia de patógenos entéricos. *E. coli*, como huésped constante del intestino del hombre y de los animales, es considerado el coliforme más estrechamente asociado con la fuente fecal y el testigo más específico de contaminación fecal reciente (Pascual, 1989). De todas maneras, aunque hay serotipos patógenos comprendidos dentro de esta especie, la presencia de *E. coli* en un alimento no representa una “detección directa” de la presencia de patógenos, únicamente implica un cierto riesgo de que pudieran estar presentes, sin guardar ninguna estrecha correlación con la presencia de salmonelas u otros patógenos (ICMSF, 2000).

Por otro lado el grupo de los **coliformes** comprende a los microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, gram-negativos, bacilos no esporulados que fermentan la lactosa, forman ácido y gas tras su incubación a 35°C tras 48 horas. Este grupo contiene entre otros a *E. coli* y a diversas especies pertenecientes a otros géneros de la familia *Enterobacteriaceae*. En términos prácticos los coliformes están comprendidos por los siguientes géneros, que son generalmente detectados por las pruebas para coliformes: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter* (ICMSF, 2000), aunque el grupo coliformes puede contener microorganismos no incluidos o provisionalmente incluidos en la familia *Enterobacteriaceae* como las *Aeromonas*.

Dado que los coliformes se pueden encontrar en el intestino del hombre y los animales, pero también en otros ambientes como el suelo, plantas, cáscara de huevo, etc., como microorganismos indicadores no presentan buena especificidad, sin embargo, se utilizan con frecuencia como indicadores de contaminación fecal por las siguientes razones:

- su frecuencia en heces
- porque se detectan fácilmente
- y porque poseen unas características muy semejantes a las de los miembros patógenos de las *Enterobacteriaceae* (Pascual, 1989).

En varios laboratorios de todo el mundo y principalmente en Europa (APHA, 2001) se hace uso del recuento en placa de, en teoría, todos los miembros de la familia ***Enterobacteriaceae***, tanto los tipos lactosa + como los lactosa -, como grupo indicador

de contaminación fecal (Mossel, 1985). Esta prueba es frecuentemente utilizada por las siguientes razones:

- las bacterias del grupo coliformes constituyen un grupo mal definido taxonómicamente, ya que su recuento puede incluir toda una serie de bacterias diferentes según los criterios utilizados para su incubación o lectura de los resultados
- una prueba sólo para bacterias lactosa positivas puede llevar a resultados falsamente seguros si predominan las lactosa negativas
- *Salmonella* puede ser en los alimentos más resistente frente a las influencias desfavorables que *E. coli* u otros coliformes, por lo que, de nuevo, la ausencia de estos últimos microorganismos puede llevar a conclusiones falsas (ICMSF, 2000).

Por último, dentro de los microorganismos habitualmente usados como indicadores de la calidad microbiológica de los alimentos, la valoración de las **bacterias mesófilas esporuladas**, tanto aerobias como anaerobias, especialmente en determinado tipo de alimentos como los enlatados, es también considerada como un indicador muy útil de los posibles fallos higiénicos en el proceso de obtención del alimento. Si la presencia de esporulados es detectada esto podría implicar que se han podido dar las circunstancias necesarias para que esté presente un patógeno tan peligroso como *Clostridium botulinum*, aunque no necesariamente se hayan dado las condiciones para la producción de la toxina, por lo que también está bastante difundido y aceptado el uso de estos microorganismos como indicadores de microorganismos patógenos esporulados.

Por otro lado, cuando estos microorganismos se encuentran en cantidades anormalmente elevadas en alimentos refrigerados o deshidratados, o en proporción excesivamente grandes respecto a la población total, existe el riesgo de que entre ellos puedan encontrarse patógenos como *C. perfringes*, *C. botulinum* o *Bacillus cereus*, que representarían un peligro tanto en alimentos ya elaborados como para su uso como ingredientes (ICMSF, 2000).

Otro de los atributos de calidad de los productos cárnicos, importante tanto para la calidad microbiológica de los mismos como para su aceptación comercial, es la



**calidad físico-química** de los mismos, que habitualmente es valorada mediante la medición de parámetros como el pH, la actividad de agua o el contenido en sal o nitritos, a su vez objetos también de interés en este capítulo por su relación o influencia sobre el crecimiento o la supervivencia de los microorganismos evaluados.

El **pH** es un parámetro que indirectamente nos puede indicar diferentes aspectos de los productos cárnicos como la calidad de la materia prima usada (García-Rey *et al.*, 2004), la evolución de la fermentación (Houben y Hooft, 2005) y la calidad final del producto, e incluso en determinados alimentos valores anormalmente altos indicarían una posible putrefacción de los mismos con el consiguiente riesgo microbiológico que esto implicaría. Pero además de estos interesantes aspectos, su utilidad en este trabajo de investigación radica en que por si mismo actúa como uno de los factores intrínsecos que afectan al crecimiento microbiano (Jay, 2002) ya que ha sido perfectamente determinado que la mayoría de los microorganismos crece mejor a valores en torno a siete mientras que son pocos los que crecen por debajo de cuatro, especialmente las causantes de intoxicación alimentaria, constituyendo así la valoración del pH en los alimentos una útil herramienta de vigilancia de algunos peligros microbiológicos (López, 1999).

Otra parámetro físico-químico de los alimentos es la  $a_w$ , que al igual que el pH, constituye también una medida muy útil para conocer el comportamiento del producto durante su elaboración o los posibles fallos que puedan producirse durante la misma (Toldrá, 2006). Y también, al igual que sucede con el parámetro anterior, la actividad de agua constituye un factor disgenésico del crecimiento microbiano, ya que la mayoría de las bacterias no crecen por debajo de actividades de agua inferiores a 0,91, aunque patógenos como *Staphylococcus aureus* crece a valores tan bajos como 0,86 (Jay, 2002).

Por lo que respecta al **contenido en sal**, esta sustancia ha sido utilizada ya desde la antigüedad como conservante alimentario, habiendo sido precisamente la finalidad de sus primeros usos alimentarios la conservación de las carnes (Jay, 2002). La medida de este parámetro resulta especialmente conveniente ya que debido a su efecto antimicrobiano y conservador de los alimentos y por su acción de desecación tanto sobre los alimentos como sobre los microorganismos, la valoración de los niveles de sal nos ayuda a conocer la estabilidad microbiológica de los productos o su

seguridad. Además, el contenido en sal de los alimentos tiene especial repercusión sobre la calidad sensorial y la aceptación de los mismos, ya que influye notablemente sobre las características sensoriales del alimento, teniendo este aspecto especial relevancia en el caso de los productos cárnicos (Guàrdia *et al.*, 2006).

Por último, la determinación de **nitratos y nitritos**, sustancias de amplio uso en la industria cárnica, es de gran interés por varias razones, entre las que destacan: su papel en la estabilización del color rojo de la carne, su contribución a la mejora del sabor y la inhibición que realiza de algunos microorganismos alterantes y patógenos (Jay, 2002). Este último aspecto es la razón más importante de la utilización de estos aditivos, especialmente por la actividad antibotulínica del nitrito en las carnes curadas, a pesar de los posibles efectos adversos que su uso puede tener como la formación de nitrosaminas, algunas de las cuales son cancerígenas. Debido a este riesgo, las administraciones públicas de distintos países regulan su uso, en el caso de España mediante Reglamentos europeos y varios Reales Decretos todavía vigentes, principalmente el Real Decreto 1118/2007 donde se fijan los límites residuales aceptables según los distintos productos. Por lo tanto, y principalmente por motivos de seguridad alimentaria, tanto desde el punto de vista microbiológico como toxicológico, la valoración de los residuos de nitritos y nitratos en los productos cárnicos constituye un parámetro de especial interés.

El **objetivo** del presente capítulo ha sido hacer una evaluación general de la calidad higiénica y de algunos parámetros físico-químicos de distintos productos cárnicos, embutidos crudo-curados y salazones cárnicas, elaborados y comercializados en la Comunidad Autónoma de Castilla y León. Se realizó el análisis de 100 muestras repartidas entre distintas presentaciones comerciales: chorizo, lomo embuchado, cecina, jamón y salchichón, tomadas en punto de venta o directamente de fábrica. Se utilizaron para realizar esta evaluación los grupos microbianos antes descritos como indicadores de la calidad higiénica general y los parámetros físico-químicos: pH,  $a_w$  y contenido en sal, nitratos y nitritos. También se propuso establecer el grado de relación entre la calidad higiénica y otros factores como su forma de presentación comercial o el grado de manipulación de los mismos.

## **I.2. Material y métodos**

### **I.2.1. Descripción de las muestras**

Para lograr una evaluación representativa y fiable de la calidad higiénica y físico-química de productos cárnicos elaborados en la comunidad autónoma de Castilla y León fueron analizadas un total de 100 muestras, repartidas a su vez entre los productos más característicos: chorizo, salchichón, lomo, cecina de vacuno y jamón serrano, correspondiendo, aproximadamente, unas 20 muestras a cada tipo. En el muestreo también fueron incluidos algunos otros productos cárnicos singulares como cecina de conejo o lengua de vaca.

Los productos fueron adquiridos y escogidos al azar en diversos establecimientos comerciales, de venta al detalle o grandes superficies, de la provincia de León, o recibidos directamente de las industrias cárnicas, y todos ellos corresponden a productos elaborados y comercializados en la Comunidad Autónoma de Castilla y León.

En cada grupo de muestras según el producto están representadas la mayoría de las distintas presentaciones comerciales existentes en el mercado, como piezas enteras, loncheados en establecimiento minorista, envasados a vacío y/o atmósferas modificadas, loncheados o no, envasados en aceite. En la tabla I.I. se hace un resumen del total de productos analizados con sus distintas presentaciones comerciales.

Todas las muestras fueron mantenidas a refrigeración en las instalaciones del laboratorio hasta la realización de los análisis correspondientes.

**Tabla I.I. Resumen de los productos cárnicos y de las distintas presentaciones comerciales objetos de estudio en los capítulos I y II.**

<b>Producto</b>	<b>Presentación comercial</b>	<b>Tipo de envasado</b>	<b>Nº de muestras</b>
<b>Chorizo</b> 25 muestras	Pieza entera (corra o herradura)	Sin envasado	5
		Envasado en atmósfera protectora	8
	Loncheado en establecimiento minorista	Sin envasado	4
		Envasado vacío	4
Loncheado industrial	Envasado en atmósfera protectora	4	
<b>Salchichón</b> 18 muestras	Pieza entera (corra o herradura)	Sin envasado	5
		Envasado vacío o en atmósfera protectora	4
	Loncheado en establecimiento minorista	Sin envasado	4
		Envasado vacío	4
Loncheado industrial	Envasado en atmósfera protectora	1	
<b>Lomo embuchado</b> 18 muestras	Pieza entera (corra o herradura)	Sin envasado	2
		Envasado vacío	1
	Loncheado en establecimiento minorista	Sin envasado	6
		Envasado vacío	7
Loncheado industrial	Envasado en atmósfera protectora	2	
<b>Cecina de vacuno</b> 16 muestras	Taco / pieza	Envasado a vacío	2
	Loncheado en establecimiento minorista	Sin envasado	3
		Envasado vacío	4
	Loncheado industrial	Envasado en atmósfera protectora	4
		En aceite de oliva	3
<b>Jamón</b> 19 muestras	Taco / pieza	Sin envasado	1
		Envasado vacío	1
	Loncheado en establecimiento minorista	Sin envasado	7
		Envasado vacío	7
Loncheado industrial	Envasado en atmósfera protectora	3	
<b>Salami</b>	Loncheado	Envasado en atmósfera protectora	1
<b>Jamón de conejo</b>	Pieza entera	Envasado a vacío	1
<b>Cecina de equino adobada</b>	Loncheada	Envasada a vacío	1
<b>Lengua de vaca curada y cocida</b>	Loncheada	Envasada a vacío	1

## I.2.2. Análisis físico-químico

Sobre las muestras descritas en el apartado I.2.1. se realizaron los análisis físico-químicos detallados a continuación, también resumidos en la tabla I.II., utilizando en todos los casos métodos destructivos de muestreo:

1. **pH:** para la determinación de este parámetro fue utilizado el pH-metro Crison, molelo 506, previamente calibrado, provisto de un electrodo de punción. La medida se realizó sobre dos puntos elegidos al azar, siendo calculado el pH de cada producto como la media de las dos lecturas.
2.  **$a_w$ :** los equipo utilizados para la medición de este valor son los modelos LabMaster- $a_w$  de Novasina o AQUELab mod. CX2 de Decagon, en los cuales una pequeña fracción de muestra fue introducida en cápsulas de plástico, realizándose valoraciones por duplicado de cada muestra, calculando la  $a_w$  de cada producto como la media de las dos lecturas.
3. **Contenido en cloruros:** La preparación de las muestras para la valoración fue realizada mediante el siguiente protocolo de extracción de los cloruros, aplicado para cada muestra de la siguiente manera: una vez picado el producto, sin piel, se pesaron 10 g y se depositaron en un erhlenmeyer, cuyo peso exacto fue recogido con dos decimales, al cual se añadieron 150 ml de etanol al 40% (Panreac) siendo posteriormente calentado en campana durante una hora a ebullición suave. El contenido del erhlenmeyer fue traspasado a un matraz aforado de 250 ml al que se añadieron 5 ml de Carrezt 1 (solución acuosa de ferrocianuro potásico) y 5 ml de Carrezt 2 (solución acuosa de acetato de zinc), enrasándolo a 250 ml con agua miliQ y manteniéndolo 10 minutos en oscuridad. El contenido del matraz fue filtrado con una bolsa de stomacher, el equivalente a un centrifugado para eliminar grasa y partículas sólidas, y el filtrado pasado a una botella de 200 ml, previamente aclarada con agua miliQ, cuyo contenido posteriormente fue filtrado a un matraz aforado de 200 ml a través de un embudo con papel de filtro y enrasados de nuevo a 200 ml. Este contenido se trasvasó a un vaso de precipitados y se concentró al 50% por evaporación del alcohol mediante calor, tras lo cual se volvió a pasar la muestra a un matraz aforado y se enrasó a 200 ml con agua miliQ. De la muestra así preparada se tomaron las alícuotas correspondientes para valorar los cloruros. La valoración de los cloruros se llevó a cabo por el método Carpentier-Vohlard, realizándose la

valoración de cada muestra preparada de la siguiente manera. Tras depositar en un erhlenmeyer los siguientes reactivos: 10 ml de solución 0,1 N de nitrato de plata (Panreac), 1 ml de ácido nítrico concentrado (Panreac), 1 ml sulfato férrico amónico al 4% (Panreac), 10 ml del extracto obtenido y 50 ml de agua destilada, y dejándolo reposar durante 10 minutos en la oscuridad, el exceso de nitrato de plata fue valorado con sulfocianuro al 0,1 N (Panreac) hasta que se produjo el viraje. El tanto por ciento de cloruros fue calculado con la siguiente fórmula:  $\% \text{ClNa} = (14,625 (10-n))/P$ , donde "P" es el peso en gramos de la muestra de la que se ha obtenido, y "n" es el volumen en ml de la solución de sulfocianuro gastados en la valoración.

4. **Contenido en nitratos y nitritos:** Para la medición de estos parámetros se tomaron como referencia los requisitos analíticos de las ISO/DIS 2918 e ISO/DIS 3091 recomendadas para productos cárnicos. Las muestras fueron preparadas según el protocolo antes descrito para la extracción de los cloruros y posteriormente la valoración de los nitratos y nitritos fue llevada a cabo mediante electroforesis capilar en las instalaciones del LTI-IR de la Universidad de León. Este método realiza una medición de la absorbancia a una longitud de onda de 214 nm siendo los aniones detectados de forma indirecta por la disminución de la absorbancia en el detector al paso de los mismos.

**Tabla I.II. Protocolos normalizados de los análisis físico-químicos, métodos y/o aparatos utilizados en el capítulo I.**

Análisis físico-químico	Métodos y aparatos
pH	pH-metro de punción CRISOL, modelo 506, equipado con un electrodo combinado y de punción.
Actividad de agua	LabMaster- $a_w$ de Novasina o AQUElab mod. CX2 Decagon
Sal	La extracción de los cloruros del alimento fue llevada a cabo con agua caliente y alcohol y para la determinación de los mismos se utilizó el método Carpentier-Vohlard (ISO 1841-1:1996)
Nitratos y nitritos	ISO/DIS 2918 e ISO/DIS 3091. Se procede a la extracción de los cloruros del alimento con agua caliente y alcohol. Sobre el extracto obtenido se realiza una valoración de estos aniones mediante electroforesis capilar

"Análisis de alimentos. Métodos oficiales y recomendados por el Centro de Investigación y Control de la Calidad". Ministerio de Sanidad y Consumo. 1985.

### I.2.3. Análisis microbiológico

Para conocer la calidad higiénica de los productos analizados se realizaron distintos análisis microbiológicos. En todos los casos se utilizó un método destructivo de muestreo. De cada una de las muestras se tomaron, con ayuda de un bisturí estéril, 25 g de producto que fueron homogeneizados, utilizando como diluyente 225 ml de agua de peptona tamponada (Oxoid), en un homogenizador (Masticator, IUL) durante dos minutos. Del homogeneizado obtenido se hicieron diluciones decimales en agua de peptona bacteriológica al 1% (Oxoid) y de la solución madre y las diluciones decimales correspondientes se sembraron, siempre por duplicado, alícuotas de 1 ml o 0,1 ml según la siembra se realizase en profundidad o en superficie (APHA, 2001). Las placas así sembradas se incubaron, siempre en posición invertida, bajo las condiciones de tiempo y temperatura específicas para cada grupo microbiano.

Los grupos microbianos a estudio fueron los siguientes:

1. Recuento de flora aerobia mesófila viable. Su determinación se realizó mediante la siembra en profundidad de una alícuota de 1 ml de distintas diluciones sobre medio Agar para Recuento en Placa (Oxoid), incubando las placas sembradas a 30°C durante 48 horas (APHA, 2001).
2. Recuento de psicrotrofos aerobios. Se utilizó también la siembra en profundidad de una alícuota de 1 ml de distintas diluciones en Agar para Recuento en Placa (Oxoid), incubando las placas durante 10 días a 7°C (Jay, 2002).
3. Recuento de enterobacterias. Para la cuantificación de este grupo microbiano se utilizó la técnica de siembra en profundidad de 1 ml de las diluciones pertinentes en medio Agar Glucosa Cristal Violeta Roja Neutro y Sales Biliares (VRBGA, Oxoid), añadiendo tras la solidificación una sobrecapa del mismo medio. La incubación se lleva a cabo durante 24 horas a una temperatura de 37°C (Mossel y Moreno, 2003). Se consideran enterobacterias las colonias redondas, de unos 2 mm de diámetro, de color púrpura, y rodeadas de un halo del mismo color.
4. Recuento de *Escherichia coli* y otros coliformes fecales. Se determinaron por la técnica de siembra en profundidad de alícuotas de 1 ml de las diluciones en Agar Cromogénico Coliformes (Oxoid). Las placas fueron incubadas 24 horas a 37°C (Mossel y Moreno, 2003). Se consideraron *E. coli* las colonias redondas, pequeñas,

de color morado. Las colonias de color fucsia son consideradas como otros coliformes.

5. Recuento de esporulados aerobios y anaerobios: para la determinación de los esporulados se sembraron 10 ml del homogeneizado en botellas con 90 ml con RCM (Oxoid). Las botellas fueron calentadas a 80°C durante 10 minutos para conseguir la destrucción de las células vegetativas, lo que debería implicar la exclusiva permanencia los esporos, y posteriormente su contenido fue vertido en tres placas de Petri, que en el caso de los esporos aerobios fueron incubadas a 30°C durante 48 horas (APHA, 1992). Los esporos anaerobios se incubaron en jarras de anaerobiosis (BD Gaspaz Ez) con una atmósfera con menos del 1% de oxígeno y un porcentaje de dióxido de carbono entre el 9 y el 13% (AneroGen™, Oxoid) también a 30°C durante 48 horas (APHA, 2001).

Todo lo descrito sobre el análisis microbiológico queda esquemáticamente resumido en la tabla I.III., siendo indicado en la misma el grupo microbiano a estudio, el medio de cultivo usado, tipo de siembra y condiciones de incubación, así como las referencias seguidas en cada caso.

#### **I.2.4. Análisis estadístico**

Todos los datos obtenidos han sido tratados estadísticamente mediante el programa Excel de Windows XP y Statistica 7.



**Tabla I.III. Grupos microbianos, medios de cultivo, tipos de siembra, condiciones de incubación y referencias utilizadas para evaluar la calidad higiénica de los productos cárnicos estudiados.**

Grupo microbiano	Medio de cultivo	Condiciones	Referencia
MICROBIOTA AEROBIA MESÓFILA	Agar para recuento en placa (Oxoid)	Profundidad 30°C/48 horas,	APHA, 2001
MICROBIOTA PSICROTROFA AEROBIA	Agar para recuento en placa (Oxoid)	Profundidad 7°C/10 días	JAY, 2002
ENTEROBACTERIAS	Agar Rojo Violeta Bilis (VRGA, Oxoid)	Profundidad 37°C/24 horas	Mossel y Moreno, 2003
Coliformes <i>Escherichia coli</i>	Cromogénico coliformes (Oxoid)	Profundidad 37°C/24 horas	Mossel y Moreno ,2003
ESPORULADOS AEROBIOS	Medio clostridios reforzado (RCM, Oxoid)	Profundidad 30°C/48 horas	APHA, 2001
ESPORULADOS ANAEROBIOS	Medio clostridios reforzado (RCM, Oxoid)	Profundidad anaerobiosis 30°C/48 horas	APHA, 2001

### I.3. Resultados

#### I.3.1. Resultados de los análisis físico-químicos

Los resultados obtenidos en los análisis físico-químicos: pH, actividad de agua y porcentaje de cloruro sódico, se presentan agrupados por tipo de producto en este orden: chorizo, salchichón, jamón, cecina y lomo, en la tabla I.IV., donde también queda recogido el tratamiento estadístico de los datos.

**Tabla I.IV. Media de los resultados de los análisis del pH,  $a_w$  y porcentaje de sal, desviación estándar (DE), máximos y mínimos.**

<b>Chorizo</b>	<b>pH</b>	<b><math>a_w</math></b>	<b>%NaCl</b>
Media	5,12	0,86	1,86
DE	0,28	0,05	0,72
Máximo	5,75	0,93	3,8
Mínimo	4,73	0,76	0,59
<b>Salchichón</b>	<b>pH</b>	<b><math>a_w</math></b>	<b>%NaCl</b>
Media	5,13	0,85	2,54
DE	0,43	0,05	0,75
Máximo	5,85	0,90	4,33
Mínimo	4,09	0,73	1,02
<b>Jamón</b>	<b>pH</b>	<b><math>a_w</math></b>	<b>%NaCl</b>
Media	5,71	0,89	2,95
DE	0,24	0,03	1,17
Máximo	6,18	0,94	6,44
Mínimo	5,26	0,83	0,58
<b>Cecina</b>	<b>pH</b>	<b><math>a_w</math></b>	<b>%NaCl</b>
Media	5,83	0,90	3,04
DE	0,28	0,03	0,89
Máximo	6,44	0,93	5,18
Mínimo	5,45	0,85	1,45
<b>Lomo</b>	<b>pH</b>	<b><math>a_w</math></b>	<b>%NaCl</b>
Media	5,72	0,90	2,68
DE	0,37	0,03	0,95
Máximo	6,21	0,96	4,36
Mínimo	5,02	0,85	0,87

Respecto a los resultados de los análisis físico-químicos para los residuos de nitratos, estos quedan recogidos en la tabla I.V., donde se proporciona una media del contenido en nitratos para cada producto y el porcentaje de cada tipo de producto donde no fue detectada la presencia de nitratos, es decir, donde su posible contenido estaba por debajo del límite de detección de la técnica: 0,30 ppm. En lo referido a los nitritos, su presencia solamente fue detectada en una muestra de lomo, con un contenido de 0,89 ppm. En todas las demás muestras su posible contenido está por debajo del límite de detección de la técnica para esta sustancia por el método utilizado: 0,50 ppm.

**Tabla I.V. Resultados y tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los análisis físico-químicos del contenido en nitratos.**

Producto	Media	DE	Rango		% ND
			Máximo	Mínimo	
<b>Chorizo</b>	<b>2,78</b>	3,22	11,9	0,66	32%
<b>Salchichón</b>	<b>2,58</b>	2,51	7,87	0,33	27,78%
<b>Jamón</b>	<b>1,64</b>	0,80	3,06	0,32	21,05%
<b>Cecina</b>	<b>1,70</b>	1,20	3,60	0,32	50%
<b>Lomo</b>	<b>2,76</b>	2,85	9,57	0,36	16,67%

Media de las cantidades de nitratos detectadas en ppm

Los datos obtenidos para otros productos cárnicos singulares que no han sido englobados en los resultados anteriores se presentan en la tabla I.VI.

**Tabla I.VI. Resultados de análisis físico-químicos de otros productos cárnicos.**

Producto	pH	$a_w$	% NaCl	Nitratos	Nitritos
Jamón de conejo EV	6,05	0,900	2,30	<0,30	<0,50
Lengua de vaca curada loncheada EV	5,24	0,832	1,52	0,53	<0,50
Salami loncheado EAP	4,25	0,870	1,75	0,89	<0,50
Cecina equino adodada EV	5,35	0,910	3,49	0,32	<0,50

EV: Envasado a vacío; EAP: Envasado en Atmósfera Protectora; Nitratos y nitritos en ppm.

Otro aspecto de interés es la posible influencia de la presentación comercial del producto, ya sea por el hecho de estar loncheado o por el sistema de envasado. Las medias, máximos y mínimos calculados al respecto quedan recogidos en las siguientes tablas I.VII. y I.VIII, y en las figuras I.I. y I.II. De las muestras de cecina para ambos aspectos, y de las de jamón y lomo para el loncheado, las medias no se consideraron representativas por la gran diferencia en cuanto al número de muestras de cada presentación, tres como máximo para producto entero en cada una de ellas, y por lo tanto no han sido incluidas en dichas tablas.

**Tabla I.VII. Influencia del loncheado sobre el pH, la  $a_w$  y el porcentaje de sal.**

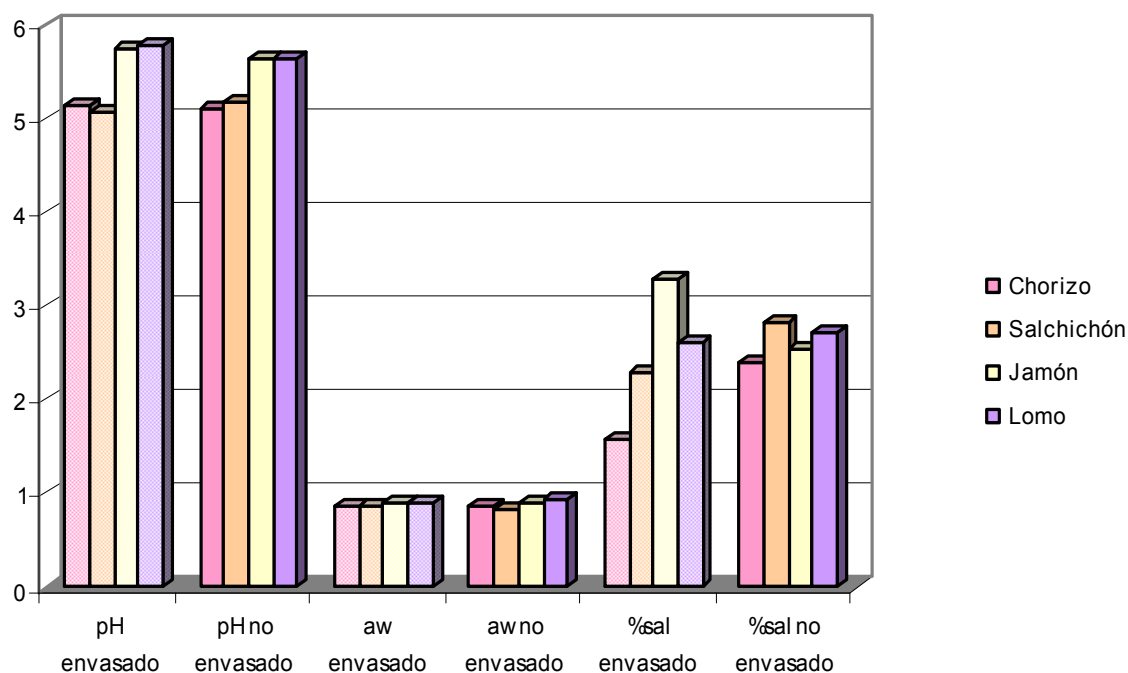
Chorizo	pH		$a_w$		%NaCl	
	Pieza	Loncha	Pieza	Loncha	Pieza	Loncha
<b>Media</b>	<b>5,05</b>	<b>5,22</b>	<b>0,872</b>	<b>0,843</b>	<b>1,90</b>	<b>1,81</b>
<b>Máximo</b>	5,46	5,75	0,927	0,934	3,80	3,80
<b>Mínimo</b>	4,73	4,86	0,760	0,781	0,59	1,17
Salchichón	pH		$a_w$		%NaCl	
	Pieza	Loncha	Pieza	Loncha	Pieza	Loncha
<b>Media</b>	<b>5,21</b>	<b>5,04</b>	<b>0,836</b>	<b>0,829</b>	<b>2,63</b>	<b>2,46</b>
<b>Máximo</b>	5,75	5,85	0,903	0,9	4,33	3,43
<b>Mínimo</b>	4,89	4,09	0,77	0,73	1,77	1,02

**Tabla I.VIII. Influencia del envasado sobre el pH, la  $a_w$  y el porcentaje de sal.**

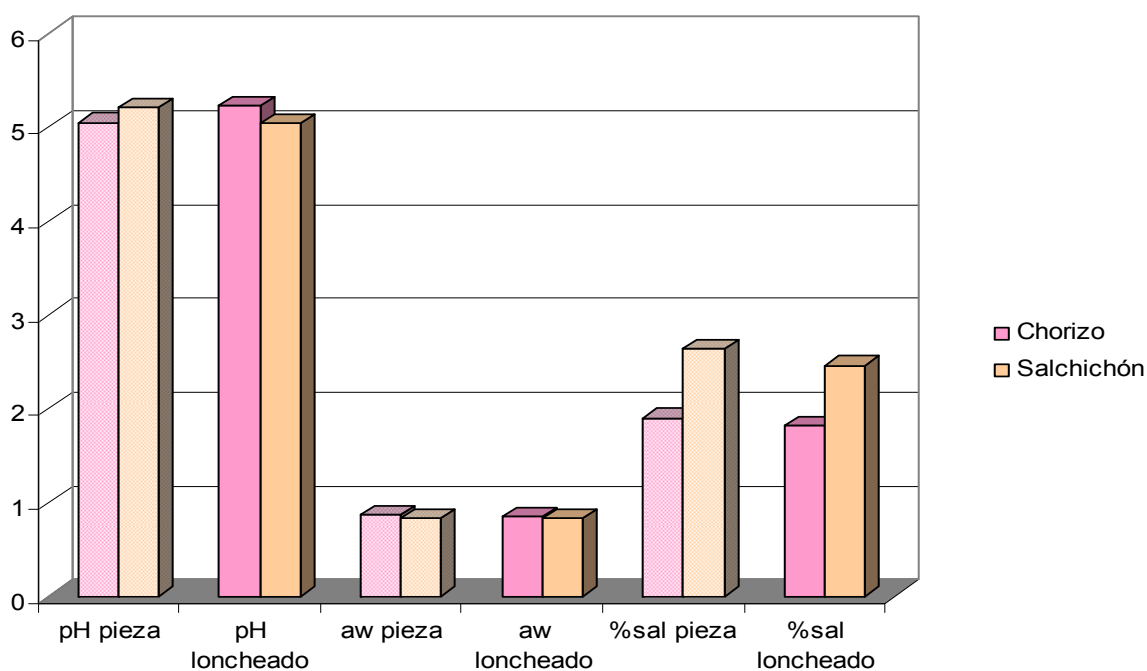
Chorizo	pH		$a_w$		%NaCl	
	E	NE	E	NE	E	NE
<b>Media</b>	<b>5,14</b>	<b>5,10</b>	<b>0,861</b>	<b>0,856</b>	<b>1,56</b>	<b>2,38</b>
<b>Máximo</b>	0,33	5,36	0,927	0,934	2,14	3,80
<b>Mínimo</b>	4,73	4,86	0,781	0,760	0,59	1,33
Salchichón	pH		$a_w$		%NaCl	
	E	NE	E	NE	E	NE
<b>Media</b>	<b>5,08</b>	<b>5,17</b>	<b>0,861</b>	<b>0,835</b>	<b>2,28</b>	<b>2,81</b>
<b>Máximo</b>	5,72	5,85	0,9	0,903	4,33	3,43
<b>Mínimo</b>	4,09	4,62	0,746	0,73	1,02	2,05
Jamón	pH		$a_w$		%NaCl	
	E	NE	E	NE	E	NE
<b>Media</b>	<b>5,76</b>	<b>5,64</b>	<b>0,893</b>	<b>0,886</b>	<b>3,27</b>	<b>2,52</b>
<b>Máximo</b>	6,18	5,98	0,939	0,925	6,44	3,68
<b>Mínimo</b>	5,26	5,28	0,845	0,830	2,31	0,50
Lomo	pH		$a_w$		%NaCl	
	E	NE	E	NE	E	NE
<b>Media</b>	<b>5,79</b>	<b>5,63</b>	<b>0,902</b>	<b>0,902</b>	<b>2,62</b>	<b>2,73</b>
<b>Máximo</b>	6,16	6,21	0,955	0,950	4,36	4,28
<b>Mínimo</b>	5,35	5,02	0,860	0,850	0,87	1,73

E: producto envasado; NE: producto no envasado.

**Figura I.I. Comparación entre parámetros físicos-químicos de productos envasados y no envasados**



**Figura I.II. Comparación entre parámetros físico-químicos de productos loncheados y en pieza**



### I.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos

Los resultados de los análisis microbiológicos se han expresado como el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias por gramo de alimento analizado y han sido agrupados según tipo de producto en la tabla I.IX., donde también se indica el porcentaje de muestras de cada producto donde no ha sido detectada la presencia de algunos grupos microbianos.

**Tabla I.IX. Recuentos medios globales de las detecciones y porcentajes de no detectados de los grupos microbianos analizados.**

Grupo microbiano	Chorizo		Salchichón		Jamón		Cecina		Lomo	
	M	%ND	M	%ND	M	%ND	M	%ND	M	%ND
<b>MAMV</b>	<b>8,74</b>		<b>8,52</b>		<b>4,47</b>		<b>6,70</b>		<b>7,61</b>	
<b>MP</b>	<b>8,38</b>		<b>8,05</b>		<b>4,58</b>		<b>6,23</b>		<b>7,35</b>	
<b>ENT</b>	<b>2,35</b>	68	<b>1,64</b>	72,2	<b>1,56</b>	84,2	<b>1,41</b>	68,8	<b>1,95</b>	83,3
<b>COLI</b>	<b>2,84</b>	76	<b>1,69</b>	66,7	<b>2,28</b>	94,7	<b>1,85</b>	81,2	<b>0,70</b>	94,4
<b><i>E. coli</i></b>	<b>2,15</b>	84	<b>1,52</b>	83,3		100		100		100
<b>EA</b>	<b>5,25</b>	4	<b>3,97</b>	11,1	<b>3,55</b>	26,3	<b>3,71</b>	50	<b>4,95</b>	27,8
<b>EANA</b>	<b>3,49</b>	32	<b>1,51</b>	38,9	<b>2,78</b>	94,7	<b>2,01</b>	81,2	<b>3,24</b>	38,9

Los datos se expresan como la media de los logaritmos decimales de las ufc/g de alimento. M: Media de los resultados obtenidos donde hay recuento. %ND: Porcentaje de muestras, del 100% de cada producto, donde no se obtienen recuentos. MAMV: Microbiota Aerobia Mesófila Viable, MP: Microbiota Psicrotrofa, ENT: Enterobacterias, COLI: Coliformes fecales, E.coli: *Escherichia coli*, EA: Esporulados Aerobios, EANA: Esporulados Anaerobios.

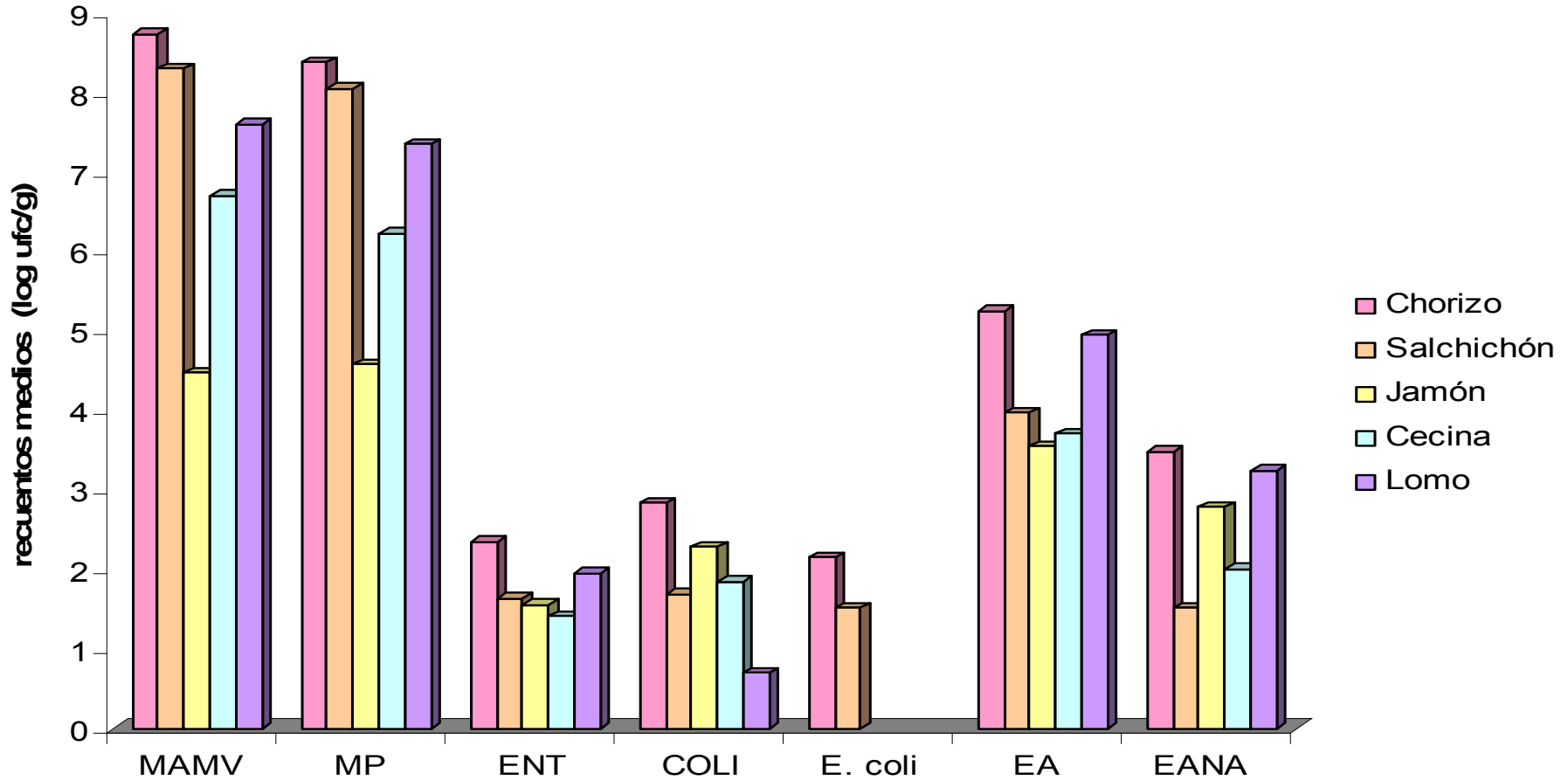
Por otro lado, en la tabla I.X. se presenta el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los análisis microbiológicos. En las figuras I.III. y I.IV. se hace una representación gráfica de los datos de las tablas I.IX. y I.X. La figura I.V. corresponde a los resultados del tratamiento estadístico (Statística 7) de la relación entre los datos de microbiota aerobia mesófila viable y microbiota psicrotrofa

Tabla I.X. Tratamiento estadístico de los datos (sólo de las muestras donde se obtuvieron recuentos) agrupados según producto y grupo microbiano

Grupo microbiano	Chorizo				Salchichón				Jamón				Cecina				Lomo			
	M	DE	Max	Min	M	DE	Max	Min	M	DE	Max	Min	M	DE	Max	Min	M	DE	Max	Min
<b>MAMV</b>	<b>8,74</b>	0,95	11,58	6,61	<b>8,52</b>	1,01	9,85	6,74	<b>4,47</b>	0,87	6,32	2,69	<b>6,70</b>	1,46	9,41	4,51	<b>7,61</b>	1,06	9,73	6,04
<b>MP</b>	<b>8,38</b>	1,04	10,06	5,9	<b>8,05</b>	1,11	9,38	5,40	<b>4,58</b>	0,93	6,58	2,69	<b>6,23</b>	1,78	9,4	2,69	<b>7,35</b>	1,56	10,34	2,69
<b>ENT</b>	<b>2,35</b>	1,55	4,92	0,70	<b>1,64</b>	0,84	2,30	0,70	<b>1,56</b>	0,45	2,08	1,30	<b>1,41</b>	0,89	2,94	0,7	<b>1,95</b>	0,89	2,77	1,00
<b>COLI</b>	<b>2,84</b>	1,39	4,92	1,30	<b>1,69</b>	1,22	3,42	0,70	<b>2,28</b>		2,28	2,28	<b>1,85</b>	1,08	3,06	1	<b>0,70</b>		0,70	0,70
<b>E. coli</b>	<b>2,15</b>	0,77	3,24	1,57	<b>1,52</b>	0,31	1,74	1,30												
<b>EA</b>	<b>5,25</b>	1,09	7,17	3,33	<b>3,97</b>	0,72	5,11	2,96	<b>3,55</b>	1,77	6,04	1,00	<b>3,71</b>	1,94	5,9	1	<b>4,95</b>	1,14	6,28	3,09
<b>EANA</b>	<b>3,49</b>	0,76	4,96	1,84	<b>1,51</b>	0,37	1,90	1,00	<b>2,78</b>		2,78	2,78	<b>2,01</b>	0,40	2,94	0,7	<b>3,24</b>	0,59	4,24	2,45

M: Media; DE: Desviación Estandar; Máximo: Valor máximo; Min: Valor mínimo. MAMV: Microbiota Aerobia Mesófila Viable, MP: Microbiota Psicrotrofa, ENT: Enterobacterias, COLI: Coliformes fecales, E.coli: *Escherichia coli*, EA: Esporulados Aerobios, EANA: Esporulados Anaerobios.

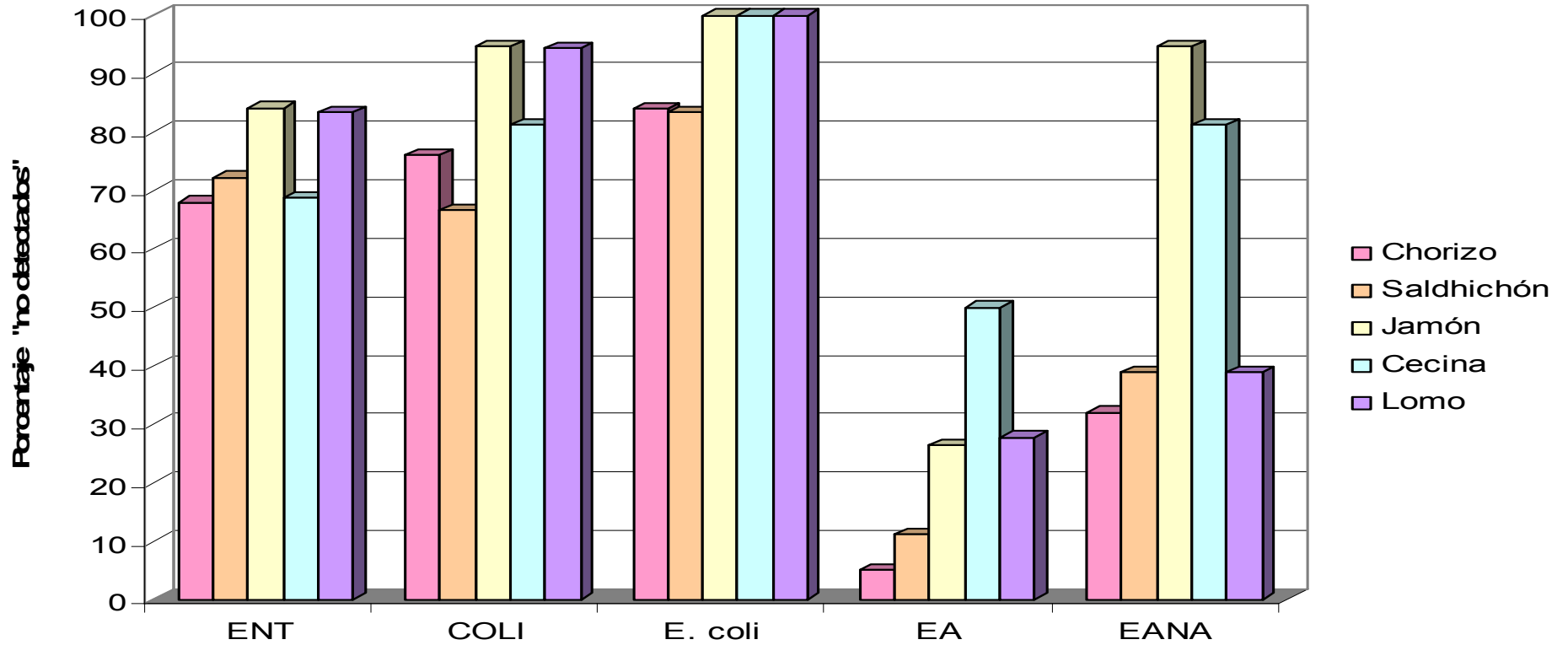
Figura I.III. Recuentos medios para cada grupo microbiano y tipo de producto.



MAMV: Microbiota Aerobia Mesófila Viable, MP: Microbiota Psicrotrofa, ENT: Enterobacterias, COLI: Coliformes fecales, *E.coli*: *Escherichia coli*, EA: Esporulados Aerobios, EANA: Esporulados Anaerobios.

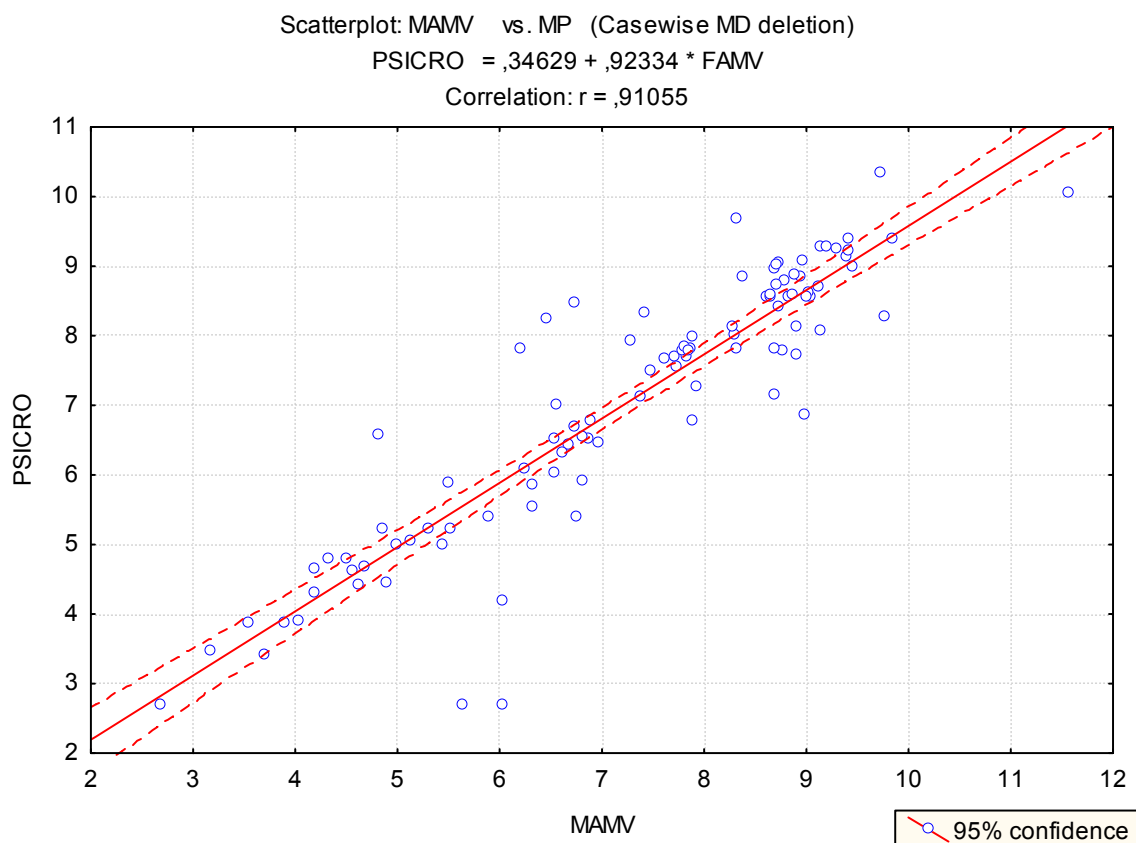


Figura I.IV. Porcentaje de microorganismos no detectados para cada grupo microbiano en cada tipo de producto



ENT: Enterobacterias, COLI: Coliformes fecales, *E.coli*: *Escherichia coli*, EA: Esporulados Aerobios, EANA: Esporulados Anaerobios.

**Figura I.V. Relación entre resultados de análisis microbiológicos para MAMV y MP.**



Otro aspecto tenido en cuenta en esta evaluación de las características microbiológicas de estos productos es la posible influencia sobre los mismos de la presentación del producto, ya sea por el loncheado o por el envasado. Las medias de estos valores quedan recogidas en las tablas I.XI. y I.XII. en las que no se especifican las desviaciones estandar, aunque es considerado oportuno indicar que éstas son muy elevadas debido a la amplia variedad de productos analizados y la gran dispersión de los datos. De las muestras de cecina para ambos aspectos, y de las de jamón y lomo para el loncheado, las medias no se consideraron representativas por la gran diferencia en cuanto al número de muestras de cada presentación, tres como máximo para producto entero en cada una de ellas, y por lo tanto no han sido incluidas en dichas tablas.

**Tabla I.XI. Influencia del loncheado sobre los valores microbiológicos de los embutidos cárnicos**

Producto		FAMV	FM	ENT	COLI	<i>E. coli</i>	EA	EANA
Chorizo	P	8,89	8,78	2,54	2,70	2,70	5,24	3,32
	%ND			61,20	84,60	84,60	7,70	38,5
	L	8,57	7,95	2,02	1,61	1,61	5,26	3,63
	%ND			75	83,30	83,30		25
Salchichón	P	8,30	8,37	1,82	1,82	1,30	3,67	1,49
	%ND			66,60	66,60	88,80		22,20
	L	8,19	8,02	2,11	2,02	1,52	4,04	1,54
	%ND			77,70	66,70	77,70	22,20	55,60

P: pieza; L: loncheado.

**Tabla I.XII. Influencia del envasado sobre los valores microbiológicos de los embutidos cárnicos**

Producto		FAMV	FM	ENT	COLI	<i>E. coli</i>	EA	EANA
Chorizo	E	8,65	8,39	1,83			5,18	3,47
	%ND			75	100	100	6,30	25
	NE	8,90	8,36	2,86	2,15	2,15	5,40	3,77
	%ND			55,50	55,50	55,50		44,40
Salchichón	E	8,06	7,94	2,06	1,76	1,3	3,92	1,63
	%ND			77,70	77,70	88,80	11,10	33,30
	NE	8,42	8,45	1,86	2	1,52	3,74	1,36
	%ND			66,60	55,50	77,70	11,10	44,40

E: envasado; NE: no envasado.

**Tabla I.XIII. Influencia del envasado sobre los valores microbiológicos de las salazones cárnicas**

Producto		FAMV	FM	ENT	COLI	<i>E. coli</i>	EA	EANA
Jamón	E	4.27	4.46				3,60	2,78
	%ND			100	100	100	18,18	90,91
	NE	4.76	4.74	1,56	2,28		3,45	
	%ND			62,5	87,5	100	37,5	100
Lomo	E	7.51	7.49	1			4,75	3,46
	%ND			90	100	100	20	50
	NE	7.72	7.18	2,42	0,70		5,51	2,87
	%ND			75	87,50	100	62,50	62,50

E: envasado; NE: no envasado.

### **I.3.3. Observaciones sobre el etiquetado de los productos cárnicos analizados**

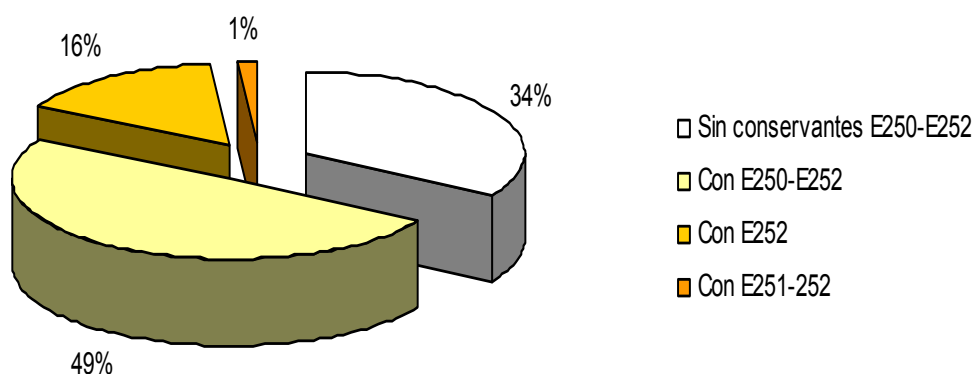
Se realizó también una revisión de las etiquetas comerciales de 76, de los 100 productos cárnicos analizados, aquellas de las que se pudo disponer, de las que se obtuvieron los siguientes datos:

- en 26 de ellas no figuraban el contenido de nitratos ni nitritos como ingredientes, de las cuales 10 corresponden a chorizo, dos a salchichón, cuatro a jamón, cinco a cecina y cinco a lomo.
- en 38 se indicaban como conservantes, o conservadores, los aditivos E250 (nitrito sódico) y E252 (nitrato potásico).
- en 12 figuraban el E252 como aditivo, no figurando directamente el E252 en dos de éstas, sino que es uno de los componentes de uno de los ingredientes, el salchichonal (Ruca), cuya composición no figuraba explícitamente en la etiqueta pero la cual es: sal, especias, dextrosa, E450, E452, E331, E301 y E252; en otras dos de estas 12 los conservantes indicados son E250 y E251 (nitrato sódico).
- siete de las muestras contienen potenciador del sabor E621 (glutamato monosódico), siendo cinco de ellas de salchichón

- 12 de las muestras indican que se han añadido colorantes, nueve de ellas corresponden a salchichón, siendo el colorante más frecuente el E124 (rojo de cochinilla A) en nueve de las muestras, después el E120 (cochinilla, ácido carmínico y carmines) en cuatro de las muestras y el E160a (carotenos) en una de ellas (aclaración: algunas de las muestras contienen más de un colorante).
- 15 de ellas indicaban el uso de extensores cárnicos: proteína de leche o de soja, de las cuales siete correspondían a salchichón
- en nueve muestras el humo venía indicado como ingrediente.

En relación a los datos obtenidos en cuanto al etiquetado de los productos cárnicos, especialmente en lo que al contenido en nitritos y nitratos se refiere, véase la figura I.VI. Es considerado oportuno matizar que en nueve de las muestras analizadas en cuyas etiquetas no figuraban estos aditivos si fueron detectadas cantidades residuales de nitratos, y en una de ellas también se detectó una cantidad residual de nitrito.

**Figura I.VI. Nitratos y nitritos en el etiquetado de los productos cárnicos analizados.**



## I.4. Discusión

### I.4.1. Discusión de los resultados de los análisis físico-químicos

Los productos analizados en este estudio representan una gran variedad de productos cárnicos y de elaboradores distintos, lo que implica diferentes formulaciones, grados de picado, tiempos de fermentación, ahumados o no, distintos tiempos de maduración, y variedad de tamaños y tallas de las piezas analizadas. Por lo tanto la discusión de los resultados obtenidos, considerando los valores medios, tiene sus limitaciones.

Por lo que respecta al **pH**, valor de interés porque dentro de las características físico-químicas es uno de los principales factores limitantes del crecimiento microbiano, las medias de los resultados obtenidos en la mediciones realizadas sobre las muestras fueron: 5,12 para el chorizo, 5,13 para el salchichón, 5,71 para el jamón, 5,83 para la cecina, y 5,72 para el lomo, como puede apreciarse en la tabla I.IV.

El chorizo y del salchichón los consideramos conjuntamente como embutidos cárnicos fermentados y pertenecientes al mismo grupo de *dry fermented sausages* (utilizando la clasificación más habitual en textos en inglés, aspecto de interés para la discusión de los datos). Los resultados obtenidos para ambos se encuentran dentro del rango esperable para este tipo de productos, cuyo pH final usualmente se encuentra entre 5,0 y 5,5 (Savic, 1985), debido principalmente a la interacción entre la producción de ácido láctico como producto de la fermentación activa, el amoníaco consecuente a la proteólisis, el contenido en agua y la capacidad tampón de las proteínas cárnicas (Varnan y Sutherland, 1998).

Por otro lado, la media de pH obtenida para este tipo de productos se puede estimar también como un buen reflejo de las preferencias de consumo de esta región. Ésta se considera dentro del área mediterránea teniendo en cuenta el país al que pertenece, donde es poco frecuente el consumo de embutidos fermentados con bajo pH (Sanz *et al.*, 1998; Spaziani *et al.*, 2008). También se caracteriza por elaborar y consumir productos que podemos denominar como *productos cárnicos fermentados de baja acidez*, según una de las posibles clasificaciones de los

embutidos crudos (Fonseca, 2009), con valores finales de pH situados por encima de 5,3 (Aymerich *et al.*, 2003). Otros autores como Pérez-Álvarez, en estudios realizados sobre la caracterización físico-química de embutidos fermentados elaborados en España, aportan un pH final para este producto algo menor, de 5,2 (Pérez-Álvarez *et al.*, 1999). Incluso otros estudios que evalúan aspectos como la fermentación, rápida o lenta, o el uso de nitratos y nitritos sobre las características físico-químicas finales de los embutidos fermentados el valor medio final del pH suele situarse en torno a 5 (Marco *et al.*, 2006; Marco *et al.*, 2008).

En contraposición a los datos obtenidos sobre el pH de embutidos fermentados típicos tenemos como único representante de productos de flavour intensamente ácido, asociado a fermentaciones rápidas y maduraciones más cortas, una muestra de salami, cuyo pH es 4,25 (ver tabla I.VI.). Este valor demuestra la clara diferencia existente entre ambos tipos de productos.

Estudiando nuestros datos sobre el pH para los embutidos fermentados y relacionándolos con otros aspectos de interés para este ensayo como el loncheado y el envasado, no se han observado diferencias significativas entre las distintas presentaciones (ver tabla I.VI.). Incluso se han encontrado resultados distintos para el chorizo y el salchichón, sobre todo en lo que se refiere a su presentación en pieza o en lonchas. El valor medio de pH en el chorizo es mayor en el producto loncheado, mientras que ocurre lo contrario en el caso del salchichón. Consideramos que este contrasentido puede deberse a la gran variabilidad de los productos analizados y la alta dispersión de los datos.

Concretamente respecto al envasado en atmósfera modificada debemos aportar, aunque no concuerda con nuestros resultados, que hay estudios que han observado una disminución del pH en productos fermentados envasados en atmósferas modificadas debido a la actividad residual de los lactobacilos y a la disolución del CO<sub>2</sub> en la carne del producto (Laleye *et al.*, 1984). En publicaciones más actuales sobre el efecto de las atmósferas modificadas esta disminución del pH ha podido ser corroborada, especialmente en relación al tiempo que el producto ha sido mantenido en envasado (Rubio *et al.*, 2007).

Por lo que respecta al jamón, en la tabla I.IV. se indica que el valor medio de pH obtenido es 5,71. Sobre este tema existe una amplia bibliografía debido al especial interés que el pH de la carne, antes de la elaboración del producto, tiene sobre las características finales del mismo, siendo numerosos los estudios realizados sobre la relación entre el pH inicial de la carne y el pH final del producto.

Un pH de 6,0 se suele considerar como el valor de pH “típico” para el jamón serrano (dry-cured ham) y así está recogido en libros de referencia sobre productos cárnicos como “*Encyclopedia of Meat Sciences*” (Toldrá, 2004), siendo el valor obtenido en nuestra investigación ligeramente menor.

García-Rey *et al.*, 2004, reflejan como resultado de sus experimentos un pH medio de 6,04 cuando la materia prima de origen tiene un pH “normal”, y 5,79 cuando se parte de materias primas con un pH bajo, habitualmente menor de 5,5. El bajo pH inicial suele estar relacionado con una merma en la calidad final del producto, sobre todo en aspectos no valorados en nuestro experimental, como la textura o el color de los jamones.

En otro estudio realizado sobre la valoración de las características fisicoquímicas de jamones (Sánchez-Molinero *et al.*, 2010), los resultados del pH medio final oscilan entre 5,49 y 5,80. En él tienen en cuenta la zona de medición, ya sea interna, con unos resultados de pH ligeramente inferiores, media o externa del jamón. Nuestro resultado queda incluido en ese rango, que es considerado por el autor como normal para este tipo de producto.

Otro aspecto de interés respecto al pH es la posible relación que existe entre el mismo y el envasado del jamón, especialmente en loncheados y envasados en atmósferas modificadas. Dada la actual tendencia hacia las nuevas formas de presentación al detalle, han ido haciendo interesantes estudios sobre los efectos de la presentación en sus características, principalmente organolépticas y también fisicoquímicas. Hay estudios, como el realizado por Parra *et al.* en 2010 que obtienen resultados de pH en torno a 5,4 y 5,7, valores considerados como normales por otros autores como Ruiz *et al.*, 1998. Estos valores son los que más se aproximan a los obtenidos en nuestro estudio, debiendo resaltar el hecho de que la mayoría de las muestras analizadas corresponden a producto loncheado.



En el caso de la cecina de vacuno, el pH medio obtenido, 5,83 (ver tabla I.IV.), es un valor muy similar a los aportados por otros trabajos y tesis doctorales realizados específicamente sobre este producto. Entre ellos podemos citar a Gutiérrez en su estudio desarrollado sobre las características químicas de la cecina elaborada en la provincia de León (Gutiérrez *et al.*, 1988), o a Molinero que también aporta datos relativos al pH (Molinero *et al.*, 2004). Estudios más recientes como el llevado a cabo por Rubio sobre la influencia del envasado en las características de la cecina (Rubio *et al.*, 2006, Rubio *et al.*, 2007), o la Tesis Doctoral realizado por Molinero en 2009 sobre el proceso de elaboración de la cecina, han obtenido en sus resultados valores medios de pH entre 5,8-5,9.

Por lo tanto, comparando nuestros datos con los aportados por los autores citados, concluimos que la cecina analizada en nuestro estudio presenta los valores normales de pH esperables para este tipo de producto.

Por lo que respecta a la influencia del envasado sobre este producto hay que indicar que la gran mayoría de las muestras analizadas correspondían a cecina loncheada envasada, por lo que el tratamiento de los datos no fue considerado relevante. En los estudios realizados por Rubio *et al.*, 2006, no ha sido observada una influencia significativa del envasado sobre el pH, independientemente del tipo de envasado: vacío, o atmósfera modificada compuesta por 20%CO<sub>2</sub>/80%N<sub>2</sub> o por 80%CO<sub>2</sub>/20%N<sub>2</sub>. Los valores obtenidos tras el envasado con los normales, hecho que también ha sido observado en nuestro experimental.

Por último, en relación al pH del lomo, el dato medio obtenido en nuestro estudio es de 5,72 (ver tabla I.IV.). Los valores relativos al mismo encontrados en la, no muy abundante, bibliografía existente al respecto para este tipo de producto (*dry-cured loin*) están en torno a seis (Ruiz-Ramírez *et al.*, 2005; Gisbert *et al.*, 2000). Esta media es ligeramente superior a nuestro dato, aunque con la limitada bibliografía consultada no podemos concluir que este pH sea el más habitual, sólo podemos indicar la diferencia existente entre los valores aportados por otros autores y el obtenido en nuestro estudio.

Por otro lado, fue encontrada información relativa al pH del lomo en un estudio realizado en 1991 por Gómez *et al.*, sobre el pH de alimentos españoles de

humedad intermedia. Para el lomo el valor medio de pH es 5,78, bastante más próximo al inferido en nuestro estudio.

Respecto a las posibles diferencias en el pH de los lomos envasados, aunque hay diferencia de valores entre los lomos envasados y no envasados, esta no se considera significativa (ver tabla I.VIII.). Por lo que respecta al loncheado, al igual que sucede con el jamón y la cecina, son más numerosas las muestras analizadas de producto loncheado que de pieza, por lo que este aspecto no ha sido tenido en cuenta.

Otro de los parámetros a estudio en el presente trabajo fue **la actividad de agua** ( $a_w$ ) de los productos analizados, dada la importancia que tiene para la estabilidad de los mismos. Los valores medios de  $a_w$ : 0,86 en el chorizo, 0,85 en el salchichón, 0,89 en el jamón, 0,90 en la cecina y en el lomo (ver tabla I.IV.).

Por lo que respecta al chorizo y al salchichón, al igual que con la discusión de los resultados del pH, también los datos obtenidos de la actividad de agua están valorados conjuntamente por tratarse de productos cárnicos de características similares. En nuestro estudio la media de los valores de  $a_w$  obtenidos es menor, teniendo en cuenta el estrecho rango de la misma, que la aportada por otros autores en estudios realizados sobre embutidos cárnicos de baja acidez. Citamos el realizado por Spaziani *et al.*, 2009, en los que la  $a_w$  final del producto (a 100 días del inicio del proceso de elaboración) está entre 0,88-0,89, o la  $a_w$  obtenida por Ruiz-Moyano *et al.*, 2011, que también en condiciones similares está en 0,89, y que según este autor es semejante a los resultados reportados por otros autores: Martín *et al.*, 2007; Benito *et al.*, 2004; Erkkilä *et al.*, 2001.

En otros ensayos también realizados sobre las características físico-químicas de los embutidos las medias de  $a_w$  obtenidas son muy próximas a la observada en nuestro ensayo, estando en torno a 0,865 (Rubio *et al.*, 2007). La autora considera este valor dentro del rango normal ya refrendado por otros autores como Hoz *et al.*, 2004 y Zanardi *et al.*, 2002.

Por otro lado, hay estudios que aportan resultados de la  $a_w$  notablemente inferiores al nuestro o a los ya referidos, como el realizado por Casquete *et al.*, 2011, que sitúa el rango a 90 días de curación entre 0,82 y 0,78. A este aspecto nos

parece oportuno matizar que dicha autora también considera sus resultados como similares a los citados anteriormente de Martín *et al.*, 2007 y Benito *et al.*, 2004.

Por lo que respecta a la posible influencia del envasado o el loncheado sobre la  $a_w$ , en nuestras valoraciones hemos observado una disminución de la misma en ambos productos loncheados respecto a los enteros, lo cual parece lógico por la mayor exposición de la superficie del producto a las condiciones ambientales, siendo más amplia esta diferencia en el caso del chorizo respecto al salchichón (ver tabla I.VII.).

Sin embargo, en lo que respecta a como se ve afectada la  $a_w$  por el envasado, hay diferencia entre ambas medias pero se observa un valor más bajo de la misma en el chorizo envasado y más alto en el salchichón (ver tabla I.VIII.), diferencia que, al igual que en el pH, relacionamos con la gran variabilidad de los productos muestreados.

Respecto al valor medio de la  $a_w$  obtenida para el jamón, 0,89 (tabla I.IV.) no podemos considerar a este dato como representativo de la actividad de agua característica de este producto, dado que en la mayoría de la bibliografía consultada sobre este parámetro un factor fundamental a tener en cuenta es la zona del jamón de la que se toma la muestra, aspecto que no podíamos valor. Blesa *et al.*, 2007 (sólo a 80 días de curación) establecen diferencias en cuanto a la medición de la  $a_w$  en función de que la muestra a medir sea tomada de la zona adyacente a la superficie, la zona intermedia cerca de la arteria femoral o cerca de la grasa subcutánea. En otros estudios, como el llevado a cabo por Cilla *et al.*, 2006 o Sánchez-Molinero *et al.*, 2010, las diferencias se establecen en función del músculo de donde se toma la muestra, ya sea *Bíceps femoris* y *Semimembranosus*.

Aún teniendo en cuenta este aspecto, que los valores de  $a_w$  obtenidos por nosotros no están realizados conociendo la zona de procedencia de la muestra, en los valores de  $a_w$  de los estudios citados podemos observar que se aproximan bastante a nuestra media. Cilla *et al.*, 2006, aportan valores entre 0,886 (*Semimembranosus*) y 0,895 (*Bíceps femoris*), rango en el se encuentra la media observada en nuestro trabajo. Sánchez-Molinero *et al.*, 2010, obtienen unos rangos, teniendo en cuenta distintas atmósferas de envasado, entre 0,857-0,864 para

*Semimembranosus* y 0,887-0,889 para *Bíceps femoris*, también similar a nuestros resultados. Respecto al estudio realizado por Blesa *et al.*, 2007, los datos no pueden compararse dado que sus valores están obtenidos sobre jamón serrano a 80 días del proceso de elaboración y nuestras  $a_w$  están medidas sobre producto final en el mercado, entendemos que con un mínimo de 6 meses de elaboración. Por lo tanto, las  $a_w$  referidas por Blesa, 0,945-0,978, son significativamente mayores que las nuestras teniendo en cuenta este hecho.

En relación al posible efecto del loncheado, este factor no lo tendremos en cuenta para la discusión de los resultados ya que la mayoría de las muestras analizadas corresponden a producto loncheado, por lo que no lo consideramos estadísticamente relevante.

Por lo que respecta a la influencia del envasado en el jamón, se percibe una diferencia notable entre el valor de este parámetro en el producto envasado y el no envasado (ver tabla I.VIII.), ya que la  $a_w$  es bastante mayor en el producto envasado, lo cual parece lógico si el envase actúa como barrera protectora y es impermeable a la humedad. Aspecto que, por otro lado, coincide con lo observado para el salchichón.

En el caso de cecina, la  $a_w$  media obtenida para este producto es 0,90 (tabla I.IV.), valor donde no se tiene en cuenta el tipo de pieza anatómica de procedencia pues es un aspecto difícilmente evaluable en la mayoría de las muestras que componían este estudio. Sin embargo, este dato es bastante similar a los aportados por otros estudios realizados sobre la cecina, como el de Rubio *et al.*, 2006. En este estudio, para una medición de tres puntos sobre babillas, como pieza anatómica de procedencia en la que no se especifican los puntos de muestreo, la evolución de la actividad de agua durante 365 días tras el envasado del producto ya elaborado, es de 0,910 a 0,899. Los autores consideran normales este rango de valores y los consideran como similares a los obtenidos por otros investigadores como Molinero *et al.*, 2004. En la Tesis Doctoral realizada por Molinero en 2009, sobre la caracterización del proceso de elaboración de la cecina, ofrece como resultados de la  $a_w$  los siguientes en función de la pieza anatómica de procedencia: babilla 0,893, tapa 0,903 y contra 0,882, entre los que no encuentra diferencias significativas. Este valor también se aproxima bastante al obtenido en nuestro estudio, por lo que

concluimos que nuestro valor medio obtenido para la  $a_w$  de la cecina se corresponde con el característico para este tipo de producto.

Respecto a la influencia del envasado y el loncheado sobre la  $a_w$  de la cecina, la mayoría de las muestras evaluadas corresponden a producto loncheado y envasado, por lo que no se pueden establecer diferencias significativas con las cecinas en pieza o no envasadas. Aún así, es interesante comentar de nuevo el estudio de Rubio *et al.*, 2006, al respecto de la  $a_w$  en cecinas envasadas, ya que han observado que este parámetro permanece constante tras 210 días de envasado. También indican que los valores finales tras el envasado son los habituales para este tipo de producto, lo que concuerda con lo observado en nuestro ensayo, donde la media de las muestras, envasadas todas menos tres, se corresponden con el valor de  $a_w$  esperado para la cecina.

Por lo que relativo a la  $a_w$  media del lomo, 0,900, este valor puede considerarse bastante bajo si lo comparamos con el aportado por Aliño *et al.*, 2010 en su estudio sobre la caracterización de la  $a_w$ , entre otros parámetros, en lomos comercializados por cinco marcas distintas. Este ensayo presenta valores medios de  $a_w$  entre 0,9205-0,934, significativamente mayores que los nuestros. Consideramos que esta diferencia puede deberse a la influencia de la elaboración y de las condiciones ambientales distintas entre ambos trabajos, pues el estudio de Aliño ha sido llevado a cabo en el entorno de Valencia y el nuestro en la comunidad autónoma de Castilla y León.

Por otro lado, en un ensayo realizado por Ruiz-Ramírez *et al.*, 2005, sobre las diferencias en cuanto al valor de  $a_w$  en el desarrollo no deseado de “cortezas” en lomo, obtienen valores en torno a 0,897-0,929 para los lomos que no desarrollan corteza y 0,811-0,908 para los que sí la desarrollan. Nuestro resultado está comprendido entre ambos rangos y lo consideramos más próximo a los lomos que no desarrollan corteza.

Por último, en el estudio ya citado para el pH de Gómez *et al.*, de 1991, en el que se realizó también una caracterización de la  $a_w$  de varios productos españoles de humedad intermedia, entre ellos el lomo, el valor aportado es de 0,883, inferior al obtenido en nuestro ensayo. Por otro lado, la diferencia de valores respecto a los

estudios más actuales, como el citado de Aliño *et al.*, 2010, podría reflejar una tendencia hacia modificaciones entre los procesos tecnológicos de elaboración y los cambios en los gustos de los consumidores.

Respecto a la influencia del loncheado en este parámetro, al igual que con el jamón y la cecina, son mayoritarias las muestras loncheadas respecto a las muestras en taco, por lo que este factor no se tendrá en cuenta para la discusión de los datos. Por otro lado, el envasado no parece tener influencia sobre la  $a_w$  del lomo ya que se obtienen los mismos valores para ambos tipos de presentaciones.

Otro parámetro importante en la caracterización físico-química de los productos cárnicos es su **contenido en sal**, debido a la notable influencia que este factor tiene sobre las características organolépticas, la estabilidad y la seguridad microbiológica de estos productos.

Respecto a la medición de este parámetro en el chorizo y en el salchichón en nuestro ensayo, obtuvimos una concentración de sal media de 1,86% para el primero y 2,54% para el segundo (tabla I.IV.). Si lo comparamos con los datos aportados por autores de libros especializados en productos cárnicos, en los cuales se recoge que la concentración habitual a la que se añade la sal a la mezcla suele estar entre el 2,5-3% (Varnam y Sutherland, 1998), nuestro dato es relativamente bajo en el caso del chorizo, pues está obtenido del producto final, y es de esperar que la concentración inicial de sal sea más baja que la final a medida que el producto se va deshidratando (Bastialnello *et al.*, 2011).

En cuanto a los ensayos científicos realizados sobre las características fisicoquímicas de este tipo de productos también los valores medios del porcentaje de sal en el producto final son más elevados que el obtenido por nosotros, como en el ya citado estudio de Ruiz-Moyano *et al.*, 2011, en el cual las concentraciones medias de sal están situadas en un rango entre 2,25-2,61 y que los autores consideran similar a los indicados en otros estudios llevados a cabo sobre *dry-fermented sausages* (Martín *et al.*, 2007, Benito *et al.*, 2004, Erkkil *et al.*, 2001). En este estudio el método usado para la determinación de los aniones es una electroforesis capilar automatizada y el método de extracción se basa en una

homogenización de la muestra en agua destilada (1:50 w/v) filtrada a través de un filtro de 0,2 µm.

En otro estudio semejante, la media de concentración de sal para este tipo de productos está situada en torno a 2,15, también superior respecto al nuestro. En este caso es destacable el amplio rango de los datos, 1,07-3,80, observación reportada especialmente por los autores que también ha sido percibida en nuestro estudio (Collell *et al.*, 2010). En los materiales y métodos de este ensayo el método usado para la valoración del porcentaje de sal es la ISO 1996 usando un titulador o valorador potenciométrico 785 DMP.

De modo excepcional, algunos trabajos publicados informan de valores detectados de hasta el 7% de sal, principalmente en chorizos de producción artesanal (Roseiro *et al.*, 2008).

Por otro lado, existen numerosas investigaciones sobre la posibilidad de reducir el contenido en sal de este tipo de embutidos, debido a que éstos tradicionalmente han sido descritos como uno de “los villanos” relacionados con la hipertensión arterial. Se estima que los productos cárnicos contribuyen con el 20-30% a la ingesta de sal media de la dieta (Bastianello *et al.*, 2011). Entre estas investigaciones destacan las realizadas principalmente sobre la reducción del contenido de sal, problemática desde el punto de vista sensorial y también desde el de la seguridad alimentaria, ya que la sal contribuye notablemente a la seguridad microbiológica (Ruusunen y Puolanne, 2005). También las efectuadas sobre la sustitución de la sal por otras sales de cloro como el KCl que tiene una eficacia antimicrobiana equivalente a la de la sal común pero que suele presentar problemas desde el punto de vista organoléptico (Bidlas y Lambert, 2008). Relativo a este último punto hemos de indicar que en ninguna de las etiquetas de los productos analizados para este experimento figura en su composición el KCl como ingrediente.

En el caso concreto de los porcentajes de sal en embutidos existen algunos trabajos que investigan específicamente este aspecto en productos de la región. En uno de ellos, Mateo, 1994, realizó un cuestionario sobre el chorizo artesanal de la provincia de León donde se recoge que aproximadamente se añaden 18 g por Kg

de picadillo a la formulación, lo que supone un 1,8% inicial de sal. En estudios más recientes, como el realizado por este grupo investigador sobre la caracterización de la marca colectiva “chorizo de León”, se obtuvieron unos porcentajes de sal en producto terminado de 1,59% (no publicado). En otro de ellos, se ha hecho una investigación de la composición media de los tipos de chorizo elaborado en la comunidad autónoma de Castilla y León según tres zonas, siendo los resultados obtenidos para el porcentaje de sal 4,1% para la zona de Zamora, 3,1% para León y 3% en Cantimpalos (Osorio *et al.*, 2004).

Por otro lado, los Reglamentos existentes para algunas de estas producciones estipulan bajos porcentajes de sal en la formulación, como el de la IGP “Chorizo de “Cantimpalos” que en su artículo 9 apartado 1.c. acota la cantidad de sal a añadir a la fórmula entre 15 y 22 gramos por cada kilogramo de carne. Para la Marca Colectiva de Calidad del “Chorizo de León” (29 de mayo de 2012) se establece en su Reglamento un límite del 2% de sal a la masa inicial.

Otro aspecto a tener en cuenta respecto al porcentaje de sal en productos como los embutidos cárnicos es el tiempo de curación de los mismos o el grado de humedad con el que salen al mercado, lo que influye notablemente sobre el porcentaje de sal en los mismos, ya que a menor curación menor porcentaje de sal.

Por todo lo expuesto, concluimos como interpretación de los porcentajes de sal en embutidos cárnicos obtenidos en nuestro ensayo que éstos, aunque un poco bajos, son representativos de la zona de producción con tendencia a una elaboración con menor contenido sal, en la que, probablemente los productos salgan al mercado con tiempos de curación cortos.

Por lo que respecta a la influencia del loncheado en los porcentajes de sal de los embutidos, apenas existen diferencias significativas entre ambos tipos de presentación (ver tabla I.VII.). Sin embargo, en el caso del envasado se observa una notable diferencia entre ambas medias, donde el porcentaje de sal es notablemente mayor en los productos no envasados que en los envasados (ver figura I.VIII.). Esta diferencia observada puede deberse al efecto barrera del envase que impide la deshidratación del producto manteniendo bajos los porcentajes de sal.



En relación al contenido en sal medio obtenido en nuestro ensayo para el jamón, 2,95% (tabla I.IV.), éste también puede considerarse bajo si lo comparamos con lo descrito como habitual en los libros especializados en productos cárnicos. Aunque Varnam y Sutherland, 1998, también resaltan el hecho de que los niveles de sal en el producto final varían ampliamente desde menos del 2% hasta más del 6%. Otros autores sitúan el porcentaje de sal del jamón curado entorno al 5-8% (Ruusunen y Puolanne, 2005).

Por otro lado, al igual que sucede con la  $a_w$  en el jamón, para la medición de este parámetro es importante conocer la zona del mismo en la que se toma la muestra, aspecto que dada las características de nuestros productos no ha podido ser valorado. Aun así, si comparamos el valor medio obtenido por nosotros con los datos aportados por otros estudios realizados sobre las características físico-químicas de esta salazón cárnica, podemos observar que, al igual que sucede con los embutidos, este valor es más bajo. Por ejemplo, en el estudio realizado por Cilla *et al.*, 2006, la media del porcentaje de sal sobre jamones con 8 meses de almacenamiento, es 3,83 para el músculo *Semimembranosus* y 5,55 para el *Biceps femoris*. En este caso, el método de valoración viene detallado exhaustivamente en la publicación y es el mismo que ha sido usado en esta Tesis, una valoración por el método Volhard, aunque el método de extracción es distinto, siendo el usado por este autor una homogenización de 10 g de muestra en 150 ml de etanol caliente (50°C) al 40% con posterior filtración por papel.

En el estudio realizado por Sánchez-Moliner *et al.*, 2010, los porcentajes de sal obtenidos son incluso más elevados, desde 5,88-6,16 para el músculo *Semimembranosus* y 6,81 hasta un sorprendente 9,60 para el *Bíceps femoris*. En este caso el método analítico utilizado es un aparato denominado analizador de cloro Technicon™ (Berman, 1976).

Teniendo en cuenta todos los aspectos discutidos anteriormente, concluimos que la variación entre nuestros resultados y los aportados por los citados autores para la concentración de sal del jamón puede deberse a las diferencias en el método utilizado tanto en la extracción como en la valoración de la sal que contienen los productos.

Por lo que respecta a la influencia del envasado en el jamón, en este producto encontramos la tendencia contraria a lo observado para los embutidos cárnicos, que hay una notable disminución del contenido en sal en los productos no envasados, con una diferencia de 0,75 entre ambos. En este caso, se da la circunstancia de que dos de las muestras envasadas presentan un elevado porcentaje en sal, 6,44 y 4,97, teniendo este aspecto una notable influencia sobre las medias obtenidas.

En relación al contenido en sal de la cecina, en nuestro estudio se obtuvo una media de 3,04 % (tabla I.IV.), dato sorprendentemente bajo en comparación con los aportados por otros autores. Aunque no son muy numerosos los estudios que analizan este parámetro dada la singularidad del producto y la no inclusión de este valor en algunos de los estudios antes citados. Para García-Herrero, 1994 y García *et al.*, 1995, el contenido en sal de esta salazón varía entre el 8 y el 15%. En estudios más recientes, como el realizado por Molinero en 2009, los valores obtenidos en la caracterización de la cecina de León mediante un protocolo basado, al igual que el nuestro, en el método Vohlard, varían en función de la pieza con la que se elabore la cecina y se encuentran entorno a 8,61% para la babilla, 12,92 para la tapa y 9,57 para la contra, datos también muy superiores a los obtenidos por nosotros. La citada autora utiliza para la determinación de los cloruros como método de extracción el Luf-Schoorl, diferente al nuestro, y como método de valoración el Volhard.

Conforme a lo que se ha concluido para el jamón en cuanto al contenido en sal se refiere, la gran diferencia de valores entre nuestro estudio y principalmente el de Molinero, 2009, podría deberse a la diferencia de métodos analíticos usados y no a una diferencia real en cuanto al contenido en sal de las cecinas analizadas. Por otro lado, en la Orden de 27 de junio de 1994 por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación Específica “Cecina de León”, se recoge específicamente en su artículo 12 que el sabor de la misma será *carne de sabor característico, poco salada*, lo que concuerda más con nuestros resultados.

Por último, el contenido medio en sal del lomo obtenido en nuestro experimental es 2,68% (tabla I.IV.). Este dato lo comparemos únicamente con los resultados aportados por un estudio de Ruiz-Ramírez, 2005, dada la escasa

bibliografía sobre este tipo de producto. En este ensayo los valores del contenido en sal vienen expresados como medias de los iones cloro y sodio, y utilizó como método analítico el aparato denominado analizador de cloro Technicon™ (Berman, 1976). Los resultados obtenidos sitúan el contenido en sal de piezas de lomo curadas en un 11,25%, dato significativamente superior al nuestro y que nos orienta a considerar, al igual que para los productos anteriores, que el método utilizado en la valoración del porcentaje de sal tiene una gran relevancia sobre los valores obtenidos.

Relativo a la influencia del envasado sobre la concentración de sal del lomo (tabla I.VIII.) no se han observado diferencias significativas entre las medias de ambas concentraciones, envasado y no envasado.

A la vista de los resultados que ha rendido nuestro estudio sobre el porcentaje de sal de los productos cárnicos es considerado oportuno hacer una matización respecto al método Carpentier-Volhard. Un aspecto de esta técnica, documentado por algunos autores, que pueden conducir a una potencial infravaloración del contenido en sal es el precipitado de tiocianato de plata, que es mucho menos soluble que el cloruro de plata, por eso, los iones tiocianato pueden reaccionar con el cloruro de plata. Si esto sucede, se gastará demasiado tiocianato en la titulación y parecerá que el contenido de cloruro fuera menor de lo que realmente es (Brunatti y Martín, 2011). La adición de nitrobenzoceno disminuye la velocidad de esta reacción, aunque no la evita, y en nuestro caso, el nitrobenzoceno no ha sido añadido debido a la toxicidad de esta sustancia, lo que puede haber conducido a unos resultados algo más bajos, el porcentaje de error que esto su ausencia puede implicar es bajo. Por lo tanto, consideramos necesario una normalización de la técnica de valoración del porcentaje de sal en productos cárnicos, dada la dispersión observada entre los resultados de los distintos trabajos publicados.

Por último, el **contenido en nitratos y nitritos** de las muestras analizadas será discutido conjuntamente para todos los productos cárnicos sin distinción de clase, ya que los resultados son muy similares entre ellos y será enfocado desde el punto de vista de la seguridad y el cumplimiento de la normativa común a todos ellos en cuanto a dicho contenido se refiere.

Aclarado este punto, las cantidades medias residuales de nitratos se encuentran en un rango entre 1,64 y 2,78 ppm (ver tabla I.V.), siendo la cantidad máxima detectada de cualquiera de ellos de 11,9 ppm, no habiendo sido detectados en el 32% de las muestras de chorizo, 27,78% de las de salchichón, 21,05% en el jamón, 50% en el caso de la cecina y en el 16,67% de las muestras de lomo. Por lo que respecta a los nitritos, estos sólo han sido detectados en una de las 100 muestras analizadas, en concreto en una muestra de lomo donde la concentración residual era de 0,89 ppm, la de nitratos de 1,17 ppm y, curiosamente, en el etiquetado de la misma no figuraban ninguna de las sales de nitrito o nitrato incluidas en las listas de aditivos.

En todos los estudios citados anteriormente, para otros parámetros físico-químicos, también se han evaluado las cantidades residuales de nitratos y nitritos en los productos finales. Los resultados en ellos obtenidos han sido muy similares a los nuestros, donde apenas se han detectado la presencia de nitratos o nitritos o se han encontrado en cantidades muy pequeñas, cercanas a cero y siempre por debajo de 50 ppm. Por citar algunos de estos estudios mencionamos los de Pérez-Álvarez *et al.*, 1999, Marco *et al.*, 2008 y 2006, Sanz *et al.*, 1998.

El aspecto más importante desde el punto de vista de la presencia y detección de nitratos y nitritos en los productos cárnicos es la preocupación por la posible formación de nitrosaminas, originadas por la reacción de los nitritos añadidos al alimento, o reducidos desde los nitratos añadidos, con las aminas secundarias presentes en el mismo. Las nitrosaminas son consideradas desde hace tiempo como agentes carcinogénicos y mutagénicos (IARC, 1978). También preocupa la posibilidad de intoxicación o metahemoglobinemia por productos cárnicos con distribuciones poco homogéneas de los ingredientes, más frecuente en productos artesanales.

Estos riesgos han dado lugar a una normativa cada vez más restrictiva respecto al límite permitido de estos aditivos en los alimentos, entre los que se incluyen los productos cárnicos. La normativa de más reciente aplicación es el Reglamento CE n.º 1333/2008 sobre aditivos alimentarios en la que, aunque actual, se sigue remitiendo temporalmente a la aplicación, en cuanto a nitratos y nitritos se refiere, a la Directiva 95/2/CE que a su vez está transpuesta y actualizada a la

legislación española mediante los Reales Decretos RD 142/2002 y RD 1118/2007. Mientras, dichos aditivos están siendo reevaluados para su inclusión en los anexos correspondientes, cuya fecha límite de reevaluación es el 31 de diciembre de 2015 (Reglamento UE n.º 257/2010).

Basándonos en esta normativa, la cantidad máxima de nitritos que puede añadirse durante la fabricación de productos cárnicos, expresada como mg/kg de  $\text{NaNO}_2$  es 150. La dosis residual máxima de nitritos, expresada como mg/kg de  $\text{NaNO}_2$ , para productos cárnicos curados en seco es 100 ppm, tanto si son productos con denominación española o no española. En cuanto a los nitratos la cantidad máxima que puede añadirse durante la fabricación, expresada en mg/kg como  $\text{NaNO}_3$ , es de 150 para los productos cárnicos no tratados por el calor. Para los productos cárnicos tradicionales curados en seco como el salchichón y el chorizo de larga duración y sin la adición de nitrito ni sódico ni potásico, la cantidad residual máxima es de 250 ppm. En cuanto a la cantidad residual máxima de nitratos en productos como el jamón curado, la paleta curada, lomo embuchado, cecina y similares, con o sin denominación española, ésta es de 250 mg/kg expresados como  $\text{NaNO}_3$ .

Por lo tanto, según la aplicación de la normativa vigente, nuestros resultados indican que todas las muestras analizadas cumplen con la legislación actual respecto a los límites residuales de nitratos y nitritos, estando éstos presentes en cantidades muy inferiores a dichos límites e incluso no siendo detectados en un elevado porcentaje de las muestras, por lo que pueden considerarse como seguros en este aspecto.

#### **I.4.2. Discusión de los resultados de los análisis microbiológicos**

Para facilitar la discusión de los resultados obtenidos se ha dividido este punto en dos apartados, en los que han sido agrupados los productos según el proceso de elaboración utilizado.

Por un lado se discutirán los resultados de los análisis microbiológicos del chorizo y el salchichón conjuntamente por tratarse ambos de productos embutidos fermentados. El resto de los productos evaluados, cecina, jamón y lomo, serán agrupados bajo la denominación de salazón cárnica ya que se trata de productos

elaborados a partir de piezas enteras aunque, estrictamente, el lomo debería considerarse como embutido adobado al tratarse de una pieza entera ha sido incluida en el mismo grupo que las salazones cárnicas.

#### **I.4.2.1. Discusión de los resultados de los análisis microbiológicos en embutidos fermentados**

Por lo que respecta a los chorizos y salchichones analizados en este estudio, estos mostraron unos recuentos elevados de **microbiota aerobia mesófila viable** (MAMV), con una media de 8,74 log ufc/g para el chorizo y 8,52 log ufc/g para el salchichón (valores expresados como el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias por gramo de producto), como puede apreciarse en la tabla I.IX.

La mayoría de los estudios consultados obtienen recuentos de bacterias aerobias mesófilas con valores comprendidos entre 8 y 9 log ufc/g después de la maduración o curado de embutidos (dry-fermented sausages). Entre ellos podemos citar a Ruiz-Moyano *et al.*, 2011, Rubio *et al.*, 2007, y el más reciente de Casquete *et al.*, 2012. También se observan resultados con valores muy cercanos a 8 log ufc/g en la publicación de Sanz *et al.*, 1998, a los 25 días de maduración, o con un valor medio final de 9,01 ufc/g en el de Lorenzo *et al.*, 2012.

Sólo en una de las publicaciones consultadas, en concreto en un estudio realizado sobre los cambios microbiológicos y bioquímicos que tienen lugar durante la maduración en el salchichón, los resultados obtenidos para el recuento total de las bacterias aerobias están en torno a  $10^6$  ufc g<sup>-1</sup>. En el mismo artículo se menciona que otros autores suelen reportar cantidades dos unidades logarítmicas mayores para el final del periodo de maduración (Lisazo *et al.*, 1999).

En relación a la **microbiota psicrotrofa** (MP) en embutidos cárnicos el recuento medio para estos productos fue de 8,38 para el chorizo y 8,05 para el salchichón (tabla I.IX.), que al igual que para la flora mesófila aerobia viable suponen un recuentos muy altos, pero aceptables para este tipo de productos en los que los microorganismos forman parte del proceso de elaboración.

Otros autores sobre ofrecen resultados similares, con recuentos de microbiota psicrotrofa, en productos como el salchichón, comprendidos entre 7,91 y 8,29 log ufc/g (Rubio *et al.*, 2007). Aunque también debe ser citado Sanz *et al.*, 1998, con resultados más bajos en sus recuentos, sobre  $10^4$  ufc/g, aunque sus recuentos para MAMV presente resultados similares a los nuestros. También hay investigaciones que ofrecen recuentos bajos, como Elías y Carrascosa, 2010, con valores entre 4,8 y 6,4 en los recuentos de microbiota psicrotrofa en su caracterización del *Paio do Alentejo*, un tipo de embutido curado ibérico. Este trabajo también presenta unos resultados bastante más bajos que los nuestros en la flora aerobia mesófila viable, entre 5,9 y 6,6.

Un aspecto bastante significativo de la evaluación de MAMV y MP es que recuentos muy elevados, con más de una unidad logarítmica por encima de la media, corresponden a muestras donde también se ha detectado la presencia de patógenos de transmisión alimentaria, destacando los recuentos de 11,58 log ufc/g MAMV y 10,06 log ufc/g MP en muestras positivas a *Listeria monocytogenes* por la técnica de PCR (tabla II.IX., capítulo II).

Por lo que respecta a como afecta el envasado o el loncheado de los productos cárnicos a los recuentos de MAMV y MS apenas se han observado diferencias significativas entre las distintas presentaciones comerciales (tabla I.XI.). Se observa cierta tendencia a que los recuentos sean superiores en las muestras enteras que en las loncheadas, lo que contradice lo afirmado por Rubio *et al.*, 2006 y Elías y Carrascosa, 2000, que para la cecina y el jamón, observan que los recuentos de MAMV son ligeramente mayores para el producto loncheado, debido a que el corte disemina los microorganismos presentes en la superficie.

Por lo tanto y en relación con la bibliografía consultada, concluimos que los recuentos obtenidos en este trabajo para la microbiota aerobia mesófila viable y la microbiota psicrotrofa son representativos de los habituales y esperables los embutidos cárnicos fermentados. Aunque elevados, estos recuentos no suponen una alteración de los productos, si no una característica habitual de los mismos, pues aunque recuentos de más de  $10^6$  microorganismos por gramo de producto serían inaceptables tratándose de otros alimentos, no es así para los productos

fermentados donde ya se parte de un elevado número de microorganismos (ICMSF, 1983).

En el análisis de los resultados de **enterobacterias, coliformes y *E. coli*** se observa que estos microorganismos no fueron detectados en el 68, 76 y 84% de las muestras de chorizo analizadas, ni en el 72,2, 66,7 ni 83,3% de las muestras de salchichón (tabla I.IX.), por lo que su incidencia en este tipo de productos es relativamente baja. Por otro lado, los recuentos medios de las muestras donde sí se detectó su presencia fueron respectivamente 2,35, 2,84 y 2,15 log ufc/g para el chorizo y 1,64, 1,69 y 1,52 log ufc/g para el salchichón (tabla I.IX.).

Ambos aspectos, la ausencia de los mismos o su baja presencia, indican, en general, la adecuada manipulación y calidad higiénica de los productos analizados. Aunque no hay una normativa específica al respecto, como ya ha sido comentado en la introducción de este capítulo, está muy extendido el uso de las enterobacterias y de los coliformes como indicadores de la posible presencia de otros microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica* y *Shigella* (Rubio, 2005), aspecto que corroboran nuestros recuentos elevados, en torno a  $10^4$  log ufc/g de enterobacterias y coliformes, encontrados en los mismos productos donde fue detectada la presencia de *Salmonella* (ver capítulo II).

Por lo que respecta a los valores encontrados en otras investigaciones, González y Díez, 2002, también han observado una desaparición de las enterobacterias a medida el chorizo va madurando. Otros estudios ofrecen unos resultados muy próximos al nuestro como el de Rubio *et al.*, 2007, donde no es detectada la presencia de enterobacterias en muchas de las muestras a partir de los 30 días de almacenamiento. En el caso de que se detecte su presencia los recuentos son también muy bajos, entre 1,03 y 1,10 log ufc/g. En los valores de 0,1 observados por Elías y Carrascosa, 2010 entendemos que en esta media se incluyen los no detectados. Algo más elevados son los recuentos obtenidos por autores como Casquete *et al.*, 2012, en su estudio sobre el chorizo y el salchichón, con unos valores medios para producto final entre 2,78 log ufc/g para enterobacterias y 1,13 ufc/g para coliformes en el chorizo, y 1,13 log ufc/g enterobacterias y 0,64 log ufc/g coliformes en el salchichón.



Por otro lado, hay autores que han detectado una elevada presencia de enterobacterias en los embutidos, como Ruiz-Moyano *et al.*, 2011, que obtienen recuentos entre 2,3-3,4 log ufc/g en VRBA para coliformes, y de un sorprendente 4,2-4,7 log ufc/g en VRBG para enterobacterias en producto final. Dichos autores consideran estos datos en concordancia con los aportados por otros trabajos sobre *dry-fermented sausages*.

Por lo que respecta a la presencia de *Escherichia coli* hay que matizar que sólo fue detectado en cuatro de las muestras de chorizo y tres de las muestras de salchichón analizadas, sin llegar a profundizar si se trataba del verdadero coli fecal, el tipo I, cuyo hábitat exclusivo es el intestino animal y humano. Destaca el hecho de que en este caso se detectó su presencia en las mismas muestras que luego resultaron positivas a *Salmonella*.

En relación a como puede afectar el loncheado y el envasado de los embutidos cárnicos a los recuentos de estos grupos microbianos, apenas se observan diferencias significativas entre las distintas presentaciones, como puede observarse en la tablas I.XI. y I.XII. Es interesante señalar que no se ha detectado la presencia de coliformes o de *E. coli* en ninguna de las muestras envasadas de chorizo.

Los recuentos obtenidos para microorganismos **esporulados aerobios y anaerobios** son 5,25 y 3,49 log ufc/g de chorizo y 3,97 y 1,51 log ufc/g de salchichón analizados. Los porcentajes de muestras donde no fueron detectados microorganismos esporulados son: el 4% y el 32%, para los esporulados aerobios y anaerobios respectivamente, en el chorizo y el 11,1% y el 38,9% en el caso del salchichón.

Son muy pocos los trabajos o investigaciones encontrados que desarrollen específicamente el estudio de microorganismos esporulados en este tipo de productos. Entre estos destaca el estudio de caracterización de la flora microbiana de un tipo tradicional de salchicha fermentada griega, a *natural fermented dry sausage*, realizado por Drosinos *et al.*, 2005. En este estudio la población de esporulados aerobios a 28 días del proceso de fermentación se sitúa en 1,80 ufc/g de producto, cifra bastante inferior a la obtenida por nosotros. En otro estudio no se

lleva a cabo una valoración de esta flora sobre el producto elaborado pero sí resulta interesante porque evalúa la carga de esporulados aerobios de las especias que habitualmente se añaden a estos productos, siendo ésta muy elevada, en torno a 5,18 ufc/g (Sanz, 2000; Gomi *et al.*, 2005). Esto indicaría que las especias habitualmente usadas como ingrediente aportan una elevada carga de flora esporulada al producto final.

Respecto a la influencia de la presentación comercial de los embutidos sobre la microbiota esporulada apenas se han observado diferencias significativas entre las medias de los valores obtenidos para cada presentación, como puede ser observado en la tabla I.XI.

Por otro lado, hay que señalar que en los embutidos, con una elevada carga bacteriana debida al proceso de fermentación, recuentos de esporulados como los encontrados en nuestro estudio son considerados normales (ICMSF, 1983). Por lo tanto, concluimos que aunque elevados, especialmente en relación al estudio de Drosinos *et al.*, 2005, los valores obtenidos son normales y representativos de este tipo de productos.

#### **I.4.2.2. Discusión de los resultados de los análisis microbiológicos en salazones cárnicas**

Las salazones cárnicas analizadas en este estudio mostraron los siguientes recuentos de **microbiota aerobia mesófila viable (MAMV)**: 4,47 (valores expresados como el logaritmo del número de unidades formadoras de colonias por gramo de producto) para el jamón, 6,70 la cecina y 7,61 el lomo (tabla I.IX.).

Los recuentos obtenidos en otras investigaciones realizadas sobre la MAMV en el jamón ofrecen, en general, resultados similares a la nuestra, como en la de Blesa *et al.*, 2008, con valores entre 4 y 5 log ufc/g de producto a 80 días de la maduración. Este estudio evalúa como se ven afectadas las características microbiológicas del jamón por el reemplazo parcial del NaCl por otras sales y en el que no se observó una influencia significativa de los cambios de formulación sobre los recuentos de mesófilos aerobios. Otro aspecto también valorado en este estudio es la carga microbiológica según zona de la pieza de donde se tome la muestra, ya sea de zonas cercanas a la superficie A, una zona intermedia B y otra cerca de la

grasa subcutánea C, siendo ligeramente mayores, más próximas a 5 log ufc/g, para la zona A y menor, más cerca de 4 ufc/g, para la zona B, e intermedio para la zona C. Este aspecto, como ya ha sido indicado, no ha podido ser tenido en cuenta en nuestro estudio dado el planeamiento de la toma de muestras.

Ligeramente inferiores son los recuentos obtenidos por García-Esteban *et al.*, 2004 en su estudio sobre la influencia del envasado en diferentes atmósferas, con valores para jamones serranos de Teruel con un año de curación tras un envasado de ocho semanas, de 3,97 log ufc/g a vacío, 3,29 en N<sub>2</sub> y 3,63 en una atmósfera de 20% CO<sub>2</sub>/80%N<sub>2</sub>. En un estudio muy similar sobre el envasado de jamones loncheados con la D.O. Dehesa de Extremadura, recuentos algo inferiores fueron obtenidos: 2,43 y 1,89 log ufc/g a 60 días de envasado (Parra *et al.*, 2011). Sin embargo, para éste mismo autor, en otro estudio de 2011, realizado también sobre el envasado del jamón ibérico a 120 días, los recuentos obtenidos se sitúan por encima de los anteriormente citados, entre 4,1 y 3,4 log ufc/g, valores más próximos a los nuestros.

Especialmente interesante resulta el trabajo realizado por Martín *et al.*, 2008, en el que se estudia la influencia de la alteración conocida como *hueso hediondo* sobre las características microbiológicas de los jamones. En él los recuentos de MAMV son siempre mayores de 4 log ufc/g en el 50% de los jamones afectados por esta alteración con 24 meses de maduración. En este estudio destacan los recuentos tras 12 meses de maduración en jamones con este tipo de alteración una media de 6,51 ufc/g. Aunque este grupo microbiano no está directamente relacionado con los microorganismos causantes del deterioro, esta descrito que recuentos mayores de 6 log ufc g<sup>-1</sup> suelen presentarse en jamones con este defecto. En nuestro caso sólo en una de las muestras se obtuvo un recuento tan elevado, de 6,32 log ufc/g.

En el caso de la cecina, los recuentos de MAMV obtenidos por nosotros son ligeramente superiores a los indicados por otros autores para este mismo producto. Rubio *et al.*, 2006 y 2007, en sus publicaciones sobre la influencia de el envasado sobre las características de la cecina, informan que los recuentos obtenidos se mantienen constantes, entre 4 y 6 log ufc/g, con un aumento significativo de los mismos a medida que se prolonga el periodo de almacenamiento. Obtienen valores

con una media de 5,93 log ufc/g que se sitúan en un rango entre 4,01 log ufc/g para un envasado en 80%CO<sub>2</sub>/20%N<sub>2</sub> y 7,33 log ufc para un envasado en 20%CO<sub>2</sub>/80%N<sub>2</sub>, siendo los valores para el envasado a vacío intermedios entre las dos atmósferas indicadas.

Otra autora, Molinero, 2009, ofrece resultados bastante menores en el ensayo desarrollado para evaluar la influencia del uso de materia prima congelada o refrigerada, el tiempo de maduración o los agentes del curado sobre distintos aspectos de la cecina, incluidos los microbiológicos. Para los valores de MAMV apenas observa diferencias significativas entre ambos, estando los valores situados entre 3,50-3,74 log ufc/g para la materia prima congelada y 3,64-4,05 log ufc/g para la refrigerada. Respecto al tiempo de curado, entre los días 210 y 360 fue observada una disminución progresiva de la MAMV. Sin embargo, en relación a los recuentos obtenidos para valorar la influencia de la utilización de distintos agentes de curado, los resultados a 200 días son significativamente superiores a los obtenidos para el uso de materia prima congelada o refrigerada y para el tiempo de curación en este trabajo, pues en este caso el rango oscila entre 7 log ufc/g para el curado sólo con sal y hasta 5 log ufc/g para el curado con sal, nitratos y nitritos.

Por lo tanto, basándonos en nuestros resultados y las observaciones encontradas en la bibliografía disponible, concluimos que los recuentos de MAMV obtenidos para la cecina, aunque elevados, son característicos de este tipo de producto y no suponen un indicio de deterioro o alteración de la misma. Sí pueden estar relacionados con unos largos periodos de almacenamiento tras el envasado, dado que el 81,25% de las muestras analizadas se corresponden con cecina envasada.

Por lo que respecta al lomo, los elevados recuentos obtenidos en nuestro ensayo, 7,61 log ufc/g, son muy superiores a los documentados en otras investigaciones sobre *cured loin*, como las realizadas por Aliño *et al.*, 2009 y 2010, cuyos recuentos medios para distintas formulaciones de conservantes se sitúan entre 3,14-3,48 y 2,77-3,29 log ufc/g respectivamente. Sin embargo, para otro autor, en su evaluación de los efectos de las altas presiones sobre las características del lomo, los recuentos observados en las muestras control tras 45 días de

almacenamiento alcanzan los 5, 15 log ufc/g (Campus *et al.*, 2008), valor más aproximado al encontrado por nosotros.

Por todo lo cual, concluimos que ésta diferencia en los resultados para la MAMV puede corresponder al tipo de proceso tecnológico empleado en la elaboración del lomo, ya que en los estudios de Aliño el único ingrediente, además de la carne, son las sales de curado. Además, hay que señalar que el método utilizado en el muestreo por éste autor son lonchas de 2 cm cortadas transversalmente a la pieza y tomadas del centro del lomo, lo que podría indicar que no utiliza en el análisis la corteza exterior del mismo con más carga microbiana. Por otro lado, en el ensayo realizado por Campus *et al.*, 2008, se trabaja sobre lomos curados seleccionados del mercado local, no producidos en las condiciones controladas de un laboratorio, siendo los recuentos obtenidos bastante superiores y más próximos a los observados por nosotros.

Respecto a los recuentos de **microbiota psicrotrofa** obtenidos en este ensayo para las salazones cárnicas, éstos son: 4,58 log ufc/g para el jamón, 6,23 para la cecina y 7,25 en el lomo (tabla I.IX.).

En relación a los valores considerados como habituales para la **microbiota psicrotrofa** en el jamón y en el lomo, en las publicaciones consultadas sobre la microbiología de estos productos no se han encontrado referencias a este grupo microbiano. Por otro lado, suele existir una relación bastante estable entre los recuentos MAMV y MP, como también hemos podido comprobar en nuestro estudio (figura I.V.). Por lo tanto es esperable que, de haberse realizado la valoración de la MP en los estudios mencionados a lo largo de esta discusión, los recuentos fuesen también proporcionalmente parecidos o inferiores a los obtenidos en nuestro ensayo.

Por lo que respecta a la cecina, el nivel de MP en este producto sí es evaluado en la investigación llevada a cabo por Rubio *et al.*, 2006 y 2007, donde los valores obtenidos son a 210 días de envasado, de 5,67 log ufc/g en envasado a vacío, de 7,33 en 20%CO<sub>2</sub>/80%N<sub>2</sub>, y de 4,01 en 80%CO<sub>2</sub>/20%N<sub>2</sub>, y a 262 y 365 días de envasado a vacío, de 6,50 y 6,18 log ufc/g respectivamente, valores muy

aproximados a los observados en nuestro estudio, por lo que los consideramos representativos y habituales para este tipo de producto.

En conjunto, por lo que respecta a la influencia del envasado sobre la MAMV y la MP en jamones y lomos analizados en nuestro estudio, no en las cecinas dado que como ya ha sido indicado la mayoría de las muestras analizadas corresponden a cecina loncheada envasada (es la presentación más frecuente en los puntos de venta al consumidor), y como puede ser observado en la tabla I.XII., no se observan diferencias significativas entre ambos tipos de presentación. Este aspecto también ha sido indicado por Parra *et al.*, 2010 y 2011, que afirman que las condiciones de envasado usadas en sus experimentales (vacío, 60%N<sub>2</sub>/40%CO<sub>2</sub>, 70%Ar/30%CO<sub>2</sub>, 80%N<sub>2</sub>/20%CO<sub>2</sub>, 70%N<sub>2</sub>/30%CO<sub>2</sub>) no conducen a diferencias en los recuentos microbiológicos respecto a los valores normales esperables para el jamón ibérico.

La presencia de **enterobacterias y coliformes** no fue detectada en el 84,2 y 94,7% de las muestras de jamón, 68,8 y 81,2% de las muestras analizadas de cecina, y en el 83,3 y 94,4% de las muestras de lomo (tabla I.IX.). Esto indicaría una adecuada manipulación y calidad higiénica de los productos analizados, dado que haciendo media de todos estos datos, aproximadamente en el 85% de las muestras no fue detectada la presencia de ninguno de estos grupos bacterianos. ***Escherichia coli*** no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas de las salazones cárnicas.

Por otro lado, se puede observar una pequeña diferencia entre la presencia de estos microorganismos en el jamón y el lomo respecto a la cecina, donde el porcentaje de no detectados es menor en esta última, como puede ser observado en la figura I.IV.

Por lo que respecta a los recuentos medios obtenidos para las muestras donde si fue detectada la presencia de estos grupos microbianos, éstos son bastante bajos, lo que corrobora, junto con su ausencia en muchas de las muestras analizadas, la adecuada higiene en el procesado de estos productos y su aceptable calidad higiénica. Éstas medias son: 1,56 y 2,28 log ufc/g de enterobacterias y coliformes en el jamón, 1,41 y 1,85 en la cecina y 1,95 y 0,70 en el lomo.

Por lo que respecta a las observaciones realizadas por otros autores en el jamón, todos reflejan una baja detección de estos grupos microbianos. Para García-Esteban *et al.*, 2004, su presencia está por debajo de 10 ufc/g las enterobacterias, y por debajo de 3 ufc/g para coliformes y *E. coli* independientemente de las condiciones de envasado, ya sea a vacío o en atmósferas con un 100% de N<sub>2</sub> o un 20%CO<sub>2</sub>/80%N<sub>2</sub>. Esto coincide con las observaciones de Blesa *et al.*, 2008, en su estudio sobre la influencia de la sal utilizada en la elaboración de los mismos. En ambos estudios no se observan diferencias de la influencia del tipo de envasado o la sal utilizada sobre la microbiota estudiada. Recuentos muy bajos, siempre por debajo de 1 log ufc/g, también han sido observados por Parra *et al.*, 2010 y 2011, en sus ensayos sobre la influencia del envasado en el jamón. Por otro lado, en los jamones afectados por la alteración conocida como “hueso hediondo”, tampoco se ha observado un notable aumento de la presencia de enterobacterias, con recuentos inferiores, salvo el 33 y el 20% de los jamones analizados a 12 y 24 semanas de maduración, a 2 log ufc g<sup>-1</sup>. Sin embargo, a este grupo microbiano se le atribuye un rol importante en este tipo de deterioro (Martín *et al.*, 2008).

En la cecina, los recuentos de enterobacterias observados por Rubio *et al.*, 2006 y 2007, en sus ensayos sobre la influencia del envasado, son también muy bajos, no siendo detectada su presencia en ninguna de las muestras analizadas tras 210 días de envasado, independientemente de la atmósfera utilizada. Coincidimos con la autora en que, en las muestras en las que se detecta la presencia de enterobacterias, los recuentos son muy bajos. Un aspecto interesante de este estudio son los resultados que indican que las enterobacterias se ven significativamente más inhibidas por las atmósferas con mayor contenido en CO<sub>2</sub>, aspecto ya observado por Church en 1994 que afirma que los microorganismos Gram-negativos son más sensibles a este gas que los Gram-positivos. Para Molinero, 2009, la presencia de enterobacterias nunca es detectada en ninguno de los supuestos estudiados, refrigeración o congelación de la materia prima, uso de sales de curado y tiempo de curado.

En el caso del lomo los recuentos obtenidos para las enterobacterias y coliformes siempre están por debajo de 3 ufc/g en los estudios realizados por Aliño *et al.*, 2009 y 2010.

A modo de conclusión para estos grupos microbianos en las salazones cárnicas podemos afirmar que, en general, muestran una adecuada calidad higiénica lo que indicaría unas buenas prácticas de manipulación de los productos analizados, conclusión refrendada por los resultados obtenidos en la bibliografía consultada.

Por que respecta a la influencia del envasado sobre la calidad higiénica de los productos, evaluada mediante la presencia de enterobacterias, coliformes y *E. coli* en las mismas, se observa que los porcentajes de muestras donde no fue detectada la presencia de estos grupos son mayores, y los recuentos medios obtenidos donde si se detectó su presencia son menores, que en los productos envasados. Esto indicaría que, por lo menos en este estudio, los productos envasados muestran unas mejores calidades higiénicas que los no envasados.

Por último, los recuentos obtenidos para **esporulados, aerobios y anaerobios**, fueron: 3,55 y 2,78 log ufc/g para el jamón, 3,71 y 2,01 para la cecina y 4,95 y 3,24 para el lomo. El porcentaje de muestras en las que tras el tratamiento térmico de las mismas no fue detectado el crecimiento de microorganismos esporulados aerobios y anaerobios son: 26,3 y 94,7% para el jamón, 50 y 81,2% en la cecina y 27,8 y 38,9% en el lomo.

Respecto a este último grupo microbiano, en los artículos consultados no se hacen referencias al mismo, por lo que la discusión se centrará en nuestros datos, que indican que la presencia de esporulados anaerobios es menos frecuente y menos numerosa en todos los productos estudiados, destacando en este aspecto la notable ausencia de recuentos en el jamón. En el lomo los recuentos son más elevados y están presentes en un elevado porcentaje de las muestras.

Por lo que respecta a la repercusión del envasado sobre los esporulados, en la tabla I.XIII. podemos observar que, sorprendentemente, en todos los productos no envasados el porcentaje de muestras donde no fue detectada la presencia de esporulados es mayor. Es decir, la presencia de esporulados es menor en los productos no envasados. Sin embargo, diferencias significativas en los recuentos no han sido observadas.





## **CAPÍTULO II**

**Incidencia de microorganismos patógenos  
de transmisión alimentaria  
en productos cárnicos  
elaborados y comercializados en Castilla y León**



## II.1. Introducción

Como ya fue indicado anteriormente, de todos los parámetros de calidad es sin duda la calidad microbiológica de los alimentos, tanto desde el punto de vista sanitario, presencia de microorganismos patógenos, como higiénico, microorganismos alterantes, uno de los atributos más importantes de la misma. Esto es debido tanto a las repercusiones sanitarias de la presencia en el mercado de productos que no cumplan con los requisitos higiénicos exigidos legalmente, como a las repercusiones socioeconómicas generadas por los brotes alimentarios epidémicos debidas a la retirada de productos del mercado y el rechazo de los consumidores al asociar un determinado producto o marca con un brote que haya recibido gran cobertura mediática.

Dado que la presencia de microorganismos patógenos es uno de los principales aspectos que afectan a la seguridad de cualquier tipo de alimento, la ausencia de los mismos es un requisito prioritario tanto para los elaboradores de productos cárnicos como para las autoridades sanitarias. Este requisito ha sido recogido tanto en una legislación específica que afecta a todos los productos cárnicos, como en la relativa a los criterios de higiene que deben cumplir estos productos cuando están en el mercado, recogida en Reglamento CE n.º 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios del 15 de noviembre de 2005 (DOUE, 2005), y modificaciones posteriores: Reglamento 1441/2007 (DOUE,2007) y Reglamento 365/2010 (DOUE, 2010). En los anexos de estos Reglamentos están indicados los límites establecidos para algunos microorganismos patógenos, como son *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, que son de aplicación a los productos cárnicos en sí o a los productos cárnicos considerados como RTE. Los límites de presencia de dichos microorganismos en este tipo de productos se recogen en la tabla II.I.

Los patógenos que más habitualmente son vinculados a los productos cárnicos evaluados en este estudio son *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* y *Clostridium botulinum*, sobre los cuales se realizará a continuación una breve introducción.

**Tabla II.I. Criterios de seguridad alimentaria de aplicación en productos cárnicos en la UE.**

Categoría de alimentos	Microorganismos, sus toxinas y metabolitos	Plan muestreo		Límites	Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
1.2. Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
		5	0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria
1.3. Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
1.8. Productos cárnicos destinados a ser consumidos crudos, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto elimine este riesgo	<i>Salmonella</i>	5	0	Ausencia en 25 g	EN/ISO 6579	Productos comercializados durante su vida útil

Por lo que respecta a *Listeria monocytogenes*, este patógeno produce un cuadro patológico, denominado listeriosis, poco frecuente pero grave, con una elevada tasa de mortalidad (EFSA, 2007a), considerado como la enfermedad de transmisión alimentaria emergente más importante de la última década, cuyo repentino modo de aparición en la epimiología mundial no ha tenido precedentes (Jay, 2000, Doyle and Beuchat, 2007).

*Listeria monocytogenes* pertenece al género *Listeria*, formado por bacilos gram-positivos cortos. Es microaerófila y aneroxia facultativa y su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C, aunque como psicrotrofa, característica de particular importancia, pueden crecer a 4°C en pocos días.

Relativo a la taxonomía intragenérica de *Listeria*, en el momento actual se ha asumido que está constituido por 6 especies diferentes: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, con dos subespecies: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* y *L. ivanovii* subsp. *londonensis*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. gravi* y *L. seeligeri*. (Boerlin y cols., 1992; Rocourt y cols., 1992; Rocourt y Cossart, 1997; Rocourt, 1999), siendo la *Listeria monocytogenes* la principal causante de infecciones en los humanos (ICMSF, 1996).

Respecto a la enfermedad que produce, se conocen dos cuadros de listeriosis: invasiva y no invasiva, siendo la primera la más frecuente, también conocida como gastroenteritis febril por listerias, que cursa con vómitos y diarrea y suele ser autolimitante. La listeriosis invasiva produce un grave cuadro clínico que suele presentar un largo periodo de incubación, siendo especialmente susceptibles las personas inmunodeprimidas, en especial enfermos de SIDA, ancianos, las mujeres gestantes y personas con tratamientos inmunosupresores, aunque también puede presentarse en individuos sanos.

Pero, además de la gravedad de la sintomatología, su importancia para este estudio es que frecuentemente alimentos cárnicos RTE se ven implicados en brotes relacionados con este microorganismo (EFSA, 2006a), especialmente algunos embutidos cárnicos como el salami, donde existe una amplia y sólida documentación de toxiinfecciones asociados a los mismos (Schawtz *et al.*, 1989; Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). Por otro lado, varios estudios confirman la

prevalencia de este microorganismo en jamones o productos similares a la cecina (Levine *et al.*, 2001; Giavannini, 2006).

Otros aspectos de este microorganismo y la información relativa al mismo en relación a los productos cárnicos objeto de este estudio serán expuestos más exhaustivamente en el capítulo IV de la presente Tesis, específicamente desarrollado en torno al estudio del comportamiento de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos envasados.

Respecto a ***Salmonella spp.***, este término engloba a varias especies del mismo género constituido por bacilos gram-negativos, anaerobios facultativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (D'Aoust y Maurer, 2007). Todos los miembros de este género son móviles por flagelos peritricos, aunque hay excepciones. La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C y cataboliza la D-glucosa y otros carbohidratos con la producción de ácido y gas. Las salmonellas son oxidasa negativos y catalasa positivos, decarboxilan la lisina y la ornitina y no hidrolizan la urea. Dado que ya desde estudios tempranos se confirmó que la utilización de la lactosa y la sacarosa está mediada por plásmidos, el reconocimiento de *Salmonella* como un grupo homogéneo bioquímicamente se está volviendo obsoleto y se aconseja su reemplazo por técnica moleculares dirigidas a identificar segmentos genéticamente estables (D'Aoust y Maurer, 2007).

El nombre de *Salmonella* fue empleado por primera vez por Lignières en 1900, en honor al doctor Salmon que, junto con Smith, aisló a finales del siglo XIX un microorganismo a partir de un cerdo con cólera al que denominó *Bacillus cholerae suis*. El término genérico de *Salmonella* fue aceptado universalmente a partir de 1934 (Le Minor, 1992).

El género *Salmonella* abarca una gran grupo taxonómico compuesto, aproximadamente, por unos 2463 (Guest Editorial, 2005) o hasta 2523 (CNE, 2009) serovares reconocidos, cuya clasificación se fundamenta en los antígenos H (flagelares) y el O (somáticos). *Salmonella Typhi* y otros pocos serovares poseen un antígeno de virulencia denominado Vi (Lobby *et al.*, 2004). Históricamente, los distintos serovares de *Salmonella* fueron considerados como especies y es por esta razón que los nombres de los mismos se escribían en cursiva. Ya en 1970 los

primeros estudios de secuenciación de nucleótidos demostraron que las salmonellas estaban tan cercanamente relacionadas entre si que deberían considerarse como una única especie (Crosa *et al.*, 1973), aunque la taxonomía del género permaneció confusa durante muchos años siendo motivo de una continua controversia. En 1987 Le Minor y Popoff propusieron designar a *Salmonella enterica* como el tipo y la única especie del género *Salmonella* (Le Minor y Popoff, 1987), lo que condujo a un intenso debate en la literatura científica con propuestas a favor (Euzéby, 1999) y en contra (Yabuuchi y Ezaki, 2000), y, aunque sin un acuerdo oficial, esta acepción fue adoptada por numerosos países y organizaciones (Brenner *et al.*, 2000). Posteriormente, una decisión del *Judicial Commission of the International Committee for Systematics of Prokaryotes* dirime que el nombre de la especie principal del género *Salmonella* es ahora *Salmonella enterica* (Judicial Comisión, 2005).

Actualmente se acepta que la especie *S. enterica* está dividida en seis subespecies, basándose en las diferentes características bioquímicas y el parentesco genético entre los distintos serovares, las cuales se indican a continuación con los nombres de cada subespecie junto con su referencia en número romanos, denominación también habitual: I, *S. enterica* subsp. *enterica*, II, *S. enterica* subsp. *houtenae*, IIIa, *S. enterica* subsp. *arizonae*, IIIb, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, IV, *S. enterica* subsp. *indica* y VI, *S. enterica* subsp. *salamae* (Jay, 2002; Guest Editorial, 2005). Cuando no se dispone de sueros específicos para los diferentes antígenos de *Salmonella* spp. pero sí de los sueros para los antígenos somáticos las salmonellas se pueden clasificar en serogrupos denominados como: A, B, C, D y E (CNE, 2009). Los serovares que típicamente están implicados en salmonelosis de mamíferos, incluido el hombre, pertenecen casi invariablemente a la subespecie *enterica*. Por otro lado, dado que la inveterada costumbre de tratar algunos serovares individuales como especies se ha conservado, actualmente se denominan, o deberían denominarse, con la inicial del serovar en mayúsculas y escrito sin cursiva si se quiere mantener esta nomenclatura (Jay, 2002; Guest Editorial, 2005).

Por otro lado, en consecuencia a los avances tecnológicos que se han ido aplicando a la identificación de nuevos microorganismos y a la clasificación de los mismos, se considera oportuno indicar que mientras el debate sobre la



nomenclatura del género *Salmonella* tenía lugar otras dos especies distintas de *S. enterica* han sido descritas dentro del mismo género: *S. bongori*, previamente conocida como subgénero V según la clasificación de Kauffmann-White y después reconocida como un especie distinta (Reeves *et al.*, 1989) y *S. subterranea* (Shelobolina *et al.*, 2004; Validation list n.º 102, 2005), quedando, de momento, constituido el género *Salmonella* por tres especies.

Por lo que respecta a los cuadros clínicos producidos en humanos por la infección con miembros de la especie *Salmonella enterica*, estos básicamente se pueden agrupar en dos tipos: el más grave conocido como fiebres tifoideas o paratifoideas, en función del serovar implicado, en la que se produce una septicemia que, sin el tratamiento adecuado, puede derivar un graves complicaciones, y el más frecuente, un cuadro de gastroenteritis conocido como salmonelosis.

La salmonelosis es un síndrome causado por la ingestión de alimentos contaminados cuyos síntomas se suelen manifestar entre las 12 y las 24 horas siguientes a la ingestión. Los síntomas suelen consistir en náuseas, vómitos, dolor abdominal, dolor de cabeza, escalofríos y diarrea, pudiendo aparecer fiebre moderada, habitualmente remiten a los dos o tres días, siendo una enfermedad frecuentemente autolimitante, aunque no exenta de complicaciones. El porcentaje medio de mortalidad oscila entre el 4%, aumentado un poco en los primeros años de vida, hasta el 15% en individuos con más de 50 años. De entre todas las especies *Salmonella Cholerasuis* provoca el mayor porcentaje de mortalidad (Jay, 2002).

Son especialmente preocupantes dos aspectos importantes de este síndrome: la posibilidad, de hasta el 5%, de que el individuo permanezca como portador del microorganismo después de su curación clínica y la aparición de resistencias en el mismo causadas, entre otros factores, por el uso excesivo de antibióticos en la producción animal intensiva (D'Aoust y Maurer, 2007).

Respecto al mecanismo de acción de las salmonelas implicadas en enterocolitis no tifoideas, aunque han sido identificadas una enterotoxina y una citotoxina en las salmonelas patógenas, parece ser que desempeñan un papel

mínimo en el síndrome de gastroenteritis, causado básicamente por una adhesión de las bacterias a la mucosa intestinal con la posterior invasión de células intestinales (Jay, 2002).

En cuanto a la dosis infectiva, en tratados clásicos de Microbiología Alimentaria se cita que para que se produzca la salmonelosis generalmente son necesarios números de células del orden de  $10^7$ - $10^9$ /g (Jay, 2002) aunque la misma fuente ya cita que se han documentado brotes con recuentos relativamente bajos. En bibliografía más actual se recoge que evidencias recientes sugieren que de una a 10 células por gramo pueden constituir una dosis infectiva en humanos (D'Aoust y Maurer, 2007). Estas variaciones en cuanto al número de células que constituyen la dosis infectiva están determinadas, obviamente, por factores individuales como el estado inmune del sujeto dependiendo de la edad o de la presencia de otras patologías, y la virulencia de la cepa implicada, pero también existe la convicción de la importante influencia de la composición de los alimentos implicados, pues un denominador común de los alimentos asociados con dosis infectivas bajas es el alto contenido en grasa de los mismos (chocolates, quesos y carnes especialmente grasos).

Un aspecto importante asociado a la frecuencia con que este microorganismo se ve asociado a brotes alimentarios son sus características fisiológicas. *Salmonella* spp. está compuesto por microorganismos que se pueden describir como resilientes, que se adaptan con relativa facilidad a condiciones ambientales adversas, incluso extremas. Pueden crecer en un rango sorprendente de temperaturas, desde 54°C a 2°C, e incluso con un periodo de adaptación estas características psicrotrofas se ven potenciadas, lo que hace dudar en determinadas circunstancias de la capacidad bacteriostática de la cadena de frío (D'Aoust y Maurer, 2007). Este aspecto es especialmente preocupante cuando el producto contaminado está envasado en condiciones que inhiben al resto de la flora contaminante, lo que potenciaría el crecimiento de *Salmonella* spp. Esta capacidad de adaptación para crecer a temperaturas extremas también se ha observado a altas temperaturas.

Su gran adaptabilidad fisiológica a condiciones disgenésicas también se extiende a su más que demostrada capacidad de proliferar a valores de pH entre

4,5 y 9,5, aunque su óptimo se encuentra en torno a la neutralidad, estando bien establecido que el efecto bacteriostático o bactericida depende del ácido presente, siendo los ácidos propiónico y acético los más efectivos. Por otro lado, se ha demostrado que algunas cepas salvajes de *Salmonella* spp. pueden adaptarse, tras un preacondicionamiento *in vitro*, a pH extremadamente bajos, lo que ha despertado dudas sobre algunos productos fermentados como las embutidos crudo-curados, donde el difundido uso de *starter* en la elaboración hace que la disminución progresiva del pH pueda generar unas condiciones ambientales adecuadas para el desarrollo de posibles salmonelas presentes en los mismos, que, además, podrían suponer un riesgo mayor a su mera presencia debido a la adquisición de esta resistencia a ácidos, lo que minimizaría la capacidad antimicrobiana de los ácidos gástricos.

Por último, aunque *Salmonella* spp. es inhibida generalmente por concentraciones de sal en torno al 3 o 4%, se ha visto que la presencia de sal en productos acidificados reduce la capacidad antibacteriana de los mismos.

Todos estos aspectos fisiológicos de *Salmonella* spp., junto con su amplia distribución en el ambiente, especialmente en producción de aves y de huevos, llevan a que sea motivo de preocupación su documentada supervivencia durante largos períodos de tiempo en productos almacenados tanto a refrigeración como a temperatura ambiente y que puede conducir a la aparición de brotes de salmonelosis. Se estima que en todo el mundo se producen anualmente no menos de 1300 millones de casos de salmonelosis no tifoideas y 16,6 millones de casos de fiebres tifoideas, lo que proporciona una estimación global del problema, más, si se reconoce que la mayoría de los casos no se comunican y, por lo tanto, no se declaran (Porrero *et al.*, 2006). En Estados Unidos se ha estimado que por cada caso de salmonelosis que se notifica hay unos 30 casos más de los que no se informa, niveles que, con pocas oscilaciones, serían extrapolables a otros países desarrollados incluido el nuestro.

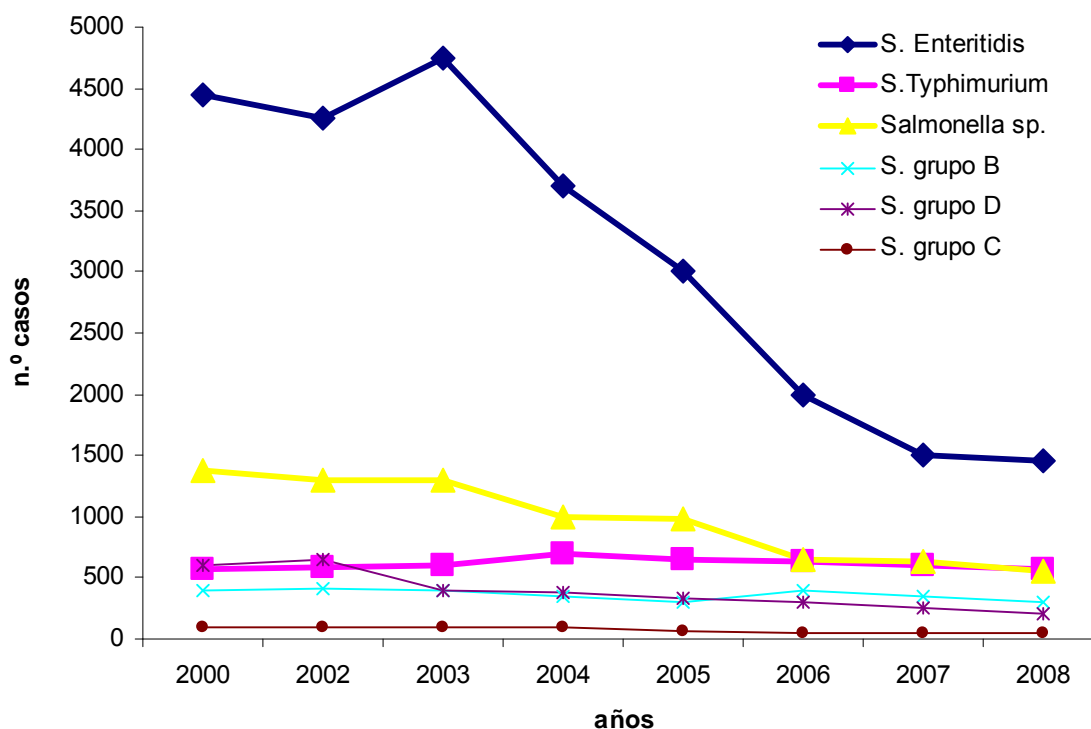
Aunque parece ser que con las nuevas medidas higiénicas aplicadas en los últimos 15 años específicamente dirigidas a controlar este patógeno, ha determinado una notable reducción de la contaminación de los productos, como ejemplo la reducción del 24% estimado en 1996 al 11%, en 1999, de la detección de

*Salmonella* spp. en la canales de broiler en USA tras la aplicación de un programa específico denominado *Final Rule* (D'Aoust y Maurer, 2007), también otros países han informado de una disminución del número anual de casos notificados en los últimos años.

Particularmente en España, entre el año 2000 y el 2008, se notificaron al Sistema de Información Microbiológica (SIM) un total de 58.407 infecciones por salmonella no tifoidea. De esos casos, en 47.078 se notificó información sobre el serotipo siendo los más frecuentes *Salmonella* Enteritidis en un 62,28% de los casos y *Salmonella* Typhimurium en el 14,41%, estando el resto repartido entre otros serogrupos (CNE, 2009). También en España, como en otros países europeos, ha sido observado un descenso continuado e importante del número de casos y de brotes de salmonelosis notificados, resultando esa disminución hasta en un 71% en el caso de *Salmonella* Enteritidis, lo que queda reflejado en la figura I.II. que representa la evolución de las notificaciones de infecciones al SIM de los principales serotipos y serogrupos de salmonella. A pesar de esta disminución en las notificaciones, la salmonelosis sigue constituyendo la segunda causa de gastroenteritis bacteriana notificada al SIM desde el año 2006, después de *Campylobacter*, y continúa siendo la causa principal de brotes de transmisión alimentaria en nuestro país (CNE, 2009), dado que es el causante del 74% de los brotes con un agente causal conocido (CNE, 2008).

Del total de los brotes de salmonelosis transmitidas por alimentos registrados en España entre los años 2004 y 2007, excluyendo los brotes hídricos, más de la mitad de los mismos se asociaron al consumo de huevo y derivados, el 55,7%, y a carne de ave el 3,5% de los mismos (CNE, 2008).

**Figura II.I. Evolución de los principales serotipos y serogrupos de *Salmonella*, de 53.801 casos notificados al SIM entre los años 2000-2008 (CNE, 2009).**



La carne y productos cárnicos también son alimentos habitualmente implicados en brotes de salmonelosis. Concretamente en el caso de España un 12,5% de los brotes causados por *Salmonella* Typhimurium se asociaron al consumo de carne o productos cárnicos, incluyendo aves, mientras que en el caso de *Salmonella* Enteritidis sólo en un 4,6% de los mismos fue relacionado con este tipo de productos (CNE, 2008).

Aunque los productos cárnicos procedentes de la industria avícola son los más comunes como fuente de brotes alimentarios causados por *Salmonella* spp., otros productos cárnicos, como los derivados del cerdo, están contaminados a menudo con este patógeno (Giovannini *et al.*, 2004). Incluso algunos informes identifican a los productos curados procedentes del porcino, tanto fermentados como secados que se puedan clasificar como RTE, como importantes vehículos de infecciones causadas por *Salmonella* spp. (Gormley *et al.*, 2010; Bover-Cid *et al.*, 2011).

Sin embargo, aunque estos informes alerten de un riesgo elevado, su incidencia en productos como las salazones cárnicas es baja (Varnam y Sutherland, 1998) y hay pocos brotes sólidamente documentados asociados a este tipo de productos, destacando los acontecidos en Finlandia y Reino Unido donde el producto implicado era un jamón curado contaminado con *Salmonella* subespecie *enterica* serovar Newport (Lyytikäinen *et al.*, 2000) o uno más antiguo, en el año 1992 y también en Reino Unido, donde el agente aislado fue *Salmonella* Typhimurium (Thornton *et al.*, 1992).

Por lo que respecta a los embutidos crudo-curados, en este tipo de productos más manipulados y con más ingredientes, sí que se han producido numerosos brotes de salmonelosis frecuentemente asociados a un producto en concreto, al salami (CDC, 2010). En algunos otros tipos de embutidos fermentados, donde su presencia es menos habitual, también se han notificado e investigado brotes, como el asociado a la presencia de *Salmonella* Goldcoast, un serotipo muy poco frecuente, acontecido en Alemania en el año 2001 (Bremen *et al.*, 2004).

Por todos estos aspectos detallados anteriormente sobre, la normativa europea existente sobre su presencia en alimentos RTE, su patogenicidad, su resiliencia y el hecho de haber estado implicada en varios brotes de salmonelosis asociados a productos cárnicos crudo-curados como los evaluados en esta Tesis, ha sido considerado de gran interés incluir la detección de la misma en este estudio.

***Staphylococcus aureus*** es otro microorganismo patógeno que habitualmente se ha visto asociados a brotes alimentarios en cuyo origen estaban involucrados productos cárnicos y cuya detección o presencia en los mismos, sin embargo, no está sometida a ninguna legislación vigente a nivel europeo.

Actualmete, este microorganismo pertenece al género *Staphylococcus* que agrupa a bacterias Gram-positivas pequeñas y esféricas, que pueden aparecer aisladas aunque suelen formar cadenas de tres o cuatro células y más frecuentemente racimos, inmóviles y no formadoras de esporos. Respecto a su clasificación, de acuerdo con el Manual Bergey's (Scheifer, 1986), el género *Staphylococcus* está encuadrado dentro de la familia *Micrococacceae*. A su vez, el género está dividido en 32 especies y subespecies. La especie tipo es

*Staphylococcus aureus* (Kloos *et al.*, 1995). Y aunque varias de las especies de este género, incluidos algunos estafilococos coagulasa-negativos, tienen potencial para causar gastroenteritis (Blaiotta *et al.*, 2004) prácticamente todos los casos de intoxicación estafilocócica son atribuidos a *Staphylococcus aureus*.

La intoxicación en humanos se debe, normalmente, a la ingesta de las toxinas producidas por el microorganismo en el alimento. Los síntomas de la intoxicación suelen corresponder con los de una gastroenteritis relativamente leve en individuos sanos, cursando habitualmente con diarrea, vómitos y calambres abdominales. Suele ser una enfermedad autolimitante, cuya gravedad dependerá de la susceptibilidad de cada individuo a la toxina, la cantidad de alimentos ingerida, la cantidad de toxina presente en el alimento y el estado de salud del individuo.

Es interesante resaltar que aunque *Staphylococcus aureus* crece en un amplio rango de temperaturas, comprendidas entre 7 y 48°C, de pH, entre 4,5 y 10, y de actividad de agua, 0,87-0,99 (Stewart *et al.*, 2002; Novick, 1993), las condiciones en las que puede producir la toxina son más limitadas.

Otra característica peculiar e importante de esta bacteria no esporulada es el ser una de las más resistentes en el medioambiente en estado latente, lo que hace que sea uno de los patógenos que más fácilmente puede contaminar los alimentos, dado que, además, se calcula que aproximadamente el 30% de la población humana sana es portadora del mismo (Forsythe, 2000), siendo encontrado en gran cantidad de diversos alimentos comerciales (Jay, 2002). Esta elevada contaminación ambiental hace que la intoxicación estafilocócica sea la responsable de un elevado porcentaje de los brotes, declarados o no, de gastroenteritis transmitida por alimentos (Jablonski *et al.*, 1997), siendo considerada como la segunda de las enfermedades de transmisión alimentaria más frecuentes (MacDonald y Griffin, 1986; Archer y Young, 1988; Cartright *et al.*, 1988; Bean *et al.*, 1990; Levine *et al.*;1991; Bunning *et al.*, 1997)

Por lo que respecta a su presencia y frecuencia de intoxicación específicamente en productos cárnicos, hay documentados brotes asociados a salazones cárnicas como el jamón (Uterman y Müller, 1992) y está demostrada su frecuente presencia en la mezcla cárnica utilizada en la elaboración de los

embutidos (González-Fandos *et al.*, 1999), lo que hace importante su evaluación en nuestro estudio.

Respecto a *Clostridium botulinum*, este patógeno poco frecuente pero causante de un grave cuadro clínico, el botulismo, ha sido tradicionalmente y específicamente asociado al consumo de productos cárnicos, especialmente embutidos y jamones ya desde el momento de su descubrimiento inicial (Van Ermengem, 1979). Pero además, el botulismo está causado por las extremadamente peligrosas neurotoxinas que este organismo produce y que son consideradas como los venenos orgánicos más potentes de los que se tiene conocimiento (Arnon *et al.*, 2001)

Este microorganismo, perteneciente al género *Clostridium*, miembro de la familia *Bacillaceae*, es un bacilo, de forma recta o ligeramente curvada, Gram-positivo anaerobio estricto y esporulado (Cato *et al.*, 1986; Düre, 2005), cuyas esporas son ovals, subterminales y distienden el soma bacteriano dándole una forma característica (Johnson *et al.*, 2007).

Dentro de esta especie la tendencia actual y ampliamente aceptada es dividir a *C. botulinum* en cuatro grupos fenotípicos llamados grupo I, II, III y IV (Franciosa, 2003; Johnson, 2007), donde el serotipo G (o grupo IV) fue renombrado como *Clostridium argentinense* (Suen *et al.*, 1988). Por otro lado han sido identificadas cepas aisladas de *Clostridium butyricum* y *Clostridium baratii* (o *barati*) capaces de producir neurotoxinas botulínicas y que han sido propuestas como grupos V y VI (Franciosa, 2003).

El botulismo es una severa afección neuromuscular cuyo síntoma clínico distintivo se caracteriza por una parálisis del músculo esquelético flácida, simétrica, bilateral y descendente (Cherrington, 2004), cuyos otros síntomas más comunes son debilidad general, diplopía, visión borrosa, midriasis y fotofobia (síntomas debidos a la temprana afectación de los nervios craneales, sobre todo la inervación ocular), dificultades para tragar y hablar, estreñimiento, náuseas y vómitos.

Aunque se distinguen 7 tipos serológicos de neurotoxinas producidas por *Clostridium botulinum*, tipos A, B, C, D, E, F y G, las toxinas implicadas en el botulismo alimentario, la variante de más interés para este trabajo, en la inmensa



mayoría corresponden a los tipos BoNT/A, BoNT/B y BoNT/E, y raramente por el tipo BoNT/F (Shapiro *et al.*, 1998; Franciosa *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005). Recientemente algún brote de botulismo ha sido asociado a cepas de *C. butyricum* botulinogénicas (Tsukamoto, 2002).

Con más de 3.353 brotes documentados y 9.767 casos documentados en todo el mundo entre 1951-1989 el botulismo alimentario es todavía el más frecuente de los tipos de botulismo (Hauschild, 1993; Hielm, 1999), siendo especialmente endémico en determinadas regiones del mundo (Franciosa *et al.*, 2003) y bastante raro en muchos países. Esta particularidad podría ser debida, además de a la propia distribución ambiental del microorganismo, aspecto ya descubierto en los años 50 en los pioneros estudios epidemiológicos llevados a cabo por Meyer, quien concluyó que el riesgo de botulismo era mayor en regiones con una alta incidencia de esporas del tipo A, B y E (Meyer y Eddie, 1950; Meyer, 1956), a los hábitos alimentarios de las distintas naciones (Bell y Kyriakides, 2005), pues frecuentemente se asocia a determinados alimentos como por ejemplo ocurre con el consumo de determinados productos de origen marino en Alaska, Canadá o Japón (Hauschild, 1993).

Por lo que respecta a la incidencia del botulismo alimentario en España, investigaciones, como la realizada por Hauschild en 1993, recogen que entre los años 1969 y 1988 se declararon un total de 63 brotes, con 198 afectados, donde el tipo B fue identificado en el 93% de los casos. Recientemente, en la última acción concertada de la Unión Europea sobre el género *Clostridium* se señala que en España la media de casos de botulismo alimentario anuales está en torno a 10 casos/año y los productos generalmente implicados son conservas caseras de vegetales (Peck *et al.*, 2004). Por otro lado, en el resumen de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en España entre los años 2004-2007 emitido por el Centro Nacional de Epidemiología se refleja que fueron detectados 10 brotes de botulismo en ese periodo de tiempo, y en el boletín semanal nº 18 del mismo organismo se recoge que durante el año 2009 fueron detectados 8 casos de botulismo de transmisión alimentaria (CNE, 2010).

Casos de botulismo han sido documentados en algunos de los productos evaluados en este estudio, como el jamón (Hauschild, 1993), la cecina (AESAN,

2005). Por otro lado, la tendencia actual hacia el envasado de este tipo de productos en atmósferas modificadas, incluido el vacío, hacen necesarios más investigaciones sobre su supervivencia, dado que en estos productos se podrían dar las condiciones necesarias para incrementar el riesgo de botulismo (Johnson, 2007).

En resumen de todo lo anteriormente expuesto, **el objetivo** del trabajo que se presenta en este capítulo ha sido conocer la incidencia de estos microorganismos patógenos de interés sanitario en productos cárnicos elaborados y comercializados en la Comunidad Autónoma de Castilla y León, así como evaluar la posible relación de su presencia con las propiedades físico-químicas de los productos, su presentación comercial o el grado de manipulación de los mismos (el loncheado).

## **II.2. Material y métodos**

### **II.2.1. Descripción de las muestras**

Para el desarrollo de este segundo capítulo de la presente Tesis se utilizaron las mismas muestras y en las mismas condiciones que las señaladas en el capítulo I.

### **II.2.2. Aislamiento y detección**

Para el desarrollo básico de los procedimientos de análisis microbiológico se siguieron en todos los casos las especificaciones de la APHA 2001. Para el aislamiento de microorganismos patógenos de transmisión alimentaria en los productos cárnicos se utilizó en todos los casos un método destructivo de muestreo, realizando los análisis microbiológicos especificados a continuación.

***Staphylococcus aureus***: De cada una de los productos se tomaron, con ayuda de un bisturí estéril, 25 g de muestra que fueron homogeneizados durante dos minutos en un homogenizador (Masticator, IUL) utilizando como diluyente 225 ml de agua de peptona tamponada (Oxoid). De este homogenizado se hicieron diluciones decimales en Agua de Peptona Bacteriológica al 0,1% (Oxoid) de las cuales se sembraron en superficie y por duplicado alícuotas de 0,1 ml de las

diluciones  $10^1$  y  $10^2$  sobre medio de asilamiento Agar Baird Parker (Oxoid). Las placas se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas (Lancette y Bennet, 2001). Se consideraron como sospechosas de pertenecer a la especie *Staphylococcus aureus* las colonias con morfología coincidente con la indicada como típica en la bibliografía: colonias negras o gris oscuras por reducción del telurito, con un diámetro superior a 2 mm, brillantes, lisas, convexas y rodeadas por zonas de aclaración de 2 a 5 mm por la acción de la lecitinasa.

***Salmonella* spp.:** Para la detección de la presencia de este grupo microbiano se siguió en parte el protocolo de la UNE-EN-ISO 6579:2002 para la detección de *Salmonella* spp. Para ello de cada una de los productos se tomaron, con ayuda de un bisturí estéril, 25 g de muestra que fueron homogeneizados durante dos minutos en un homogenizador (Masticator, IUL) utilizando como diluyente 225 ml de agua de peptona tamponada (Oxoid). Los homogenizados así obtenidos fueron incubados a  $37^\circ\text{C}$  durante 18 horas y posteriormente y en condiciones de esterilidad de los mismos se tomó 1 ml que fueron sembrados en tubo de ensayo con 9 ml de Rappaport Vassiliadis (Oxoid) para ser incubados de nuevo durante 24 horas a  $41^\circ\text{C}$  (Andrews y Hammack, 2007). De estos tubos de ensayo, previamente agitados en vortex (Selecta), que contienen este enriquecimiento se cogió con asa de platino estéril una gota de la suspensión y se sembró en estría sobre agar XLD (Xylosa, Lysine, Desoxychocolate Agar, Oxoid). La placa así sembrada se incubó 24-48 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Se consideraron como sospechosas de pertenecer a *Salmonella* spp. de las colonias crecidas en XLD las redondas de bordes lisos y color negro, con una zona ligeramente transparente de color rojizo debido al cambio de color del indicador.

***Clostridium botulinum:*** Para la detección de la posible presencia de este microorganismo en las muestras previamente se realizó un enriquecimiento en condiciones de anaerobiosis en el medio líquido no selectivo TPGY. Este medio es considerado como uno de los más adecuados para llevar a cabo un exitoso enriquecimiento y aislamiento en la evaluación de *Clostridium botulinum* en productos cárnicos (Petrova-Yanakieva y Gogov, 1999). Para ello se homogenizaron durante 2 minutos en stomacher (Masticator. IUL) 10 g de producto en 90 ml de caldo TPGY (50 g de tripotona, 5 g de peptona, 4 g de dextrosa, 20 g

de extracto de levadura y 1 g de tioglicolato sódico, todos de Oxoid) siguiendo las especificaciones de Solomon y Lilly, 2001. El homogenizado así obtenido fue incubado en la misma bolsa de homogeneización en jarra de anaerobiosis (BD Gaspaz Ez) con una atmósfera con menos del 1% de oxígeno y un porcentaje de dióxido de carbono entre el 9 y el 13% (AneroGen™, Oxoid) a 30°C durante 5 días para conseguir la recuperación y multiplicación de los clostridios posiblemente presentes. Aunque un medio selectivo para *Clostridium botulinum* ya ha sido desarrollado (Mossel y DeWaart, 1968; Dezfulian *et al.*, 1981) su uso todavía permanece limitado ya que su eficiencia ha sido cuestionada (Hobbs *et al.*, 1982), por lo que para la detección del mismo se prefirió usar la técnica de PCR sobre alícuotas de 10 ml tomadas del caldo de enriquecimiento que fueron conservadas a congelación hasta su análisis mediante la citada técnica.

Tradicionalmente, las técnicas usadas en aislamiento y detección de *Clostridium botulinum* y sus toxinas, como el ensayo en ratones, son tediosas y demasiado largas como para ofrecer una respuesta ágil y rápida a los brotes de intoxicación producidos por este microorganismo. En respuesta a esta necesidad y también como consecuencia de los continuos avances científicos, recientemente han sido desarrolladas técnicas *in-vitro* alternativas más rápidas, y también fiables, para la detección de clostridios productores de toxina A, B, E y F y de sus toxinas, como los DIG-ELISA, amp-ELISA y la PCR (Solomon y Lilly, 2001).

En el presente trabajo de investigación, para la detección e identificación de *Clostridium botulinum* en productos cárnicos se usó la técnica de biología molecular: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), cuyas bases fueron descritas en el apartado 4 de la introducción.

Esta técnica nos permite la detección e identificación a nivel genómico de *Clostridium botulinum*, mediante la visualización tras un revelado a ultravioleta de la amplificación del material genético del microorganismo, para lo cual es necesario la previa presencia del mismo en la muestra.

El procedimiento seguido para el desarrollo de la técnica de PCR ha sido agrupado en tres etapas en función del objetivo pretendido en cada una de ellas:

preparación de la muestra, amplificación del material genético y detección de los amplicones generados.

Preparación de la muestra: de los caldos de enriquecimiento obtenidos según el protocolo recogido en el apartado II.2.2. para *Clostridium botulinum* (enriquecimiento en medio TPGY durante cinco días en condiciones de anaerobiosis) se cogieron 1 ml de cada muestra, depositándolos en eppendorfs de 1,5 ml (Eppendorf) para su posterior centrifugación (Eppendorf Centrifuge 5414 D) a 10000 G durante 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue cuidadosamente eliminado mediante suaves golpes sobre papel secante. Al pellet así obtenido se le añadieron 300 µl de agua con calidad PCR (agua ultrapura tipo I (Milli-Q Gradient, Millipore), esterilizada a 121°C durante 15 minutos (Selecta) y conservada bajo luz ultravioleta durante al menos 24 horas, para garantizar la ausencia de DNA contaminante) homogenizándolo bien con la misma y volviendo a centrifugarlo a 10000 G durante 5 minutos. Este proceso de lavado de la muestra se repitió otras dos veces con el fin de obtener un buen extracto libre, en lo posible, de sustancias que interfieran en la amplificación. Tras el último lavado y sin ser centrifugada, la muestra fue incubada a 100 °C durante 15 minutos en bloque térmico (Selecta) con el fin de liberar el ADN presente en la misma y posteriormente se centrifugó de nuevo a 10000G durante un minuto para eliminar las sustancias no deseadas, quedando el ADN en el sobrenadante. De este sobrenadante se tomaron los 5 µl necesarios para el siguiente paso, siendo conservado el resto a congelación.

Amplificación del material genético: En esta etapa se procede a preparar la muestra de ADN obtenida en el paso anterior junto con los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de la misma. En un eppendorf de PCR (Eppendorf) de 0,5 ml se añadieron 10 µl de 2,5x MasterMix (5Prime) que es una mezcla que contiene la enzima *Taq* ADN polimerasa (62,5 U/ml), 125 mM KCl, ®-CA360 in 0,5%, 500 µM de cada dNTP, 75 mM Tris-HCl pH 8,3, 3,75 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0,25% Igepal u estabilizantes; 10 µl de una mezcla de 9 µl agua con calidad PCR y 0,5 µl de cada cebador (cebadores universales para todas las toxinas de *Clostridium botulinum* descritos por Campbell *et al.* 1993, ver tabla II.II.); y 5 µl de muestra.

**Tabla II.II. Cebadores utilizados en la técnica de PCR para la detección de *Clostridium botulinum* en las muestras a estudio.**

Nombre	Secuencia (5'-3')	Fragmento amplificado	Referencia
Bont1	5'-TAT RTA GGA TCY TGC TTT AAA TAT ARK WAW TGA-3'	1,1 kb de cualquier gen de la toxina botulínica	Campbell <i>et al.</i> , 1993
Bont2	5'-TTA GTW ATA GTT ACA AAA ATC CAY YTR TTT ATA TA-3'		

Paralelamente a la preparación de las muestras para el termociclado, se preparó una muestra blanco (10 µl de 2,5x MasterMix; 10 µl de una mezcla de 9 µl agua con calidad PCR y 0,5 µl de cada cebador o primer y 5 µl de agua de calidad PCR en eppendorf 0,5 µl) como modo de comprobar la ausencia de falsos positivos por contaminación de los materiales o reacciones cruzadas entre los cebadores.

Los eppendorf con todas las muestras así preparadas fueron introducidos en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) llevándose a cabo el siguiente programa de amplificación del material genético:

- un ciclo de 94°C durante tres minutos para conseguir una buena separación de las hebras de ADN
- 30 ciclos de tres etapas: desnaturalización a 92°C durante un minuto, hibridación a 47°C durante un minuto y elongación a 72°C durante dos minutos
- un ciclo de incubación final a 72°C durante 10 minutos

Detección de los amplicones generados: De las muestras termocicladas y del blanco se cogieron 5 µl de cada eppendorf para someterlos a electroforesis consiguiendo una migración de los fragmentos de DNA a través de un gel de agarosa (0,5 mg de agarosa (Certified™ PCR Agarose, Bio-Rad) en 50 ml de solución tampón TBE (Conda)) donde también se cargó el patrón de peso molecular de ADN de 1 kb (Biotools). Este gel fue sometido a la acción de un campo eléctrico (Electrophoresis Power Supply, Amersham Pharmacia Biotech) de 90 milivoltios durante 30 minutos.

Tras la migración, el gel se mantuvo sumergido en un baño con una dilución de bromuro de etidio, que actuó como agente de tinción, durante 15 minutos tras lo cual se procedió al revelado del gel a la luz ultravioleta 312 nm en transiluminador (ETX F20.M, Vilber Lourmat) donde se aprecian como positivas las muestras que ofrecen bandas refringentes con el peso molecular esperado para los cebadores utilizados y como negativas las muestras que no producen bandas refringentes.

***Listeria monocytogenes***: Con este patógeno se llevaron a cabo dos procedimientos distintos, un aislamiento y detección convencional, mediante un recuento directo del microorganismo y una detección de su posible presencia tras un enriquecimiento, y una detección por la técnica de PCR.

Por el método tradicional, para su recuento directo se homogenizaron en stomacher (Masticator, IUL) durante dos minutos 25 g de producto en 225 ml de medio Fraser ½ (Fraser, Oxoid + 1 suplemento Fraser de Oxoid por cada litro de medio). Tras una hora de reposo, de este homogenizado se sembraron en superficie 0,33 ml por placa en tres placas con Agar Cromogénico Listeria (Chromogenic Listeria Agar (ISO) Base, Oxoid) que se incubaron durante 24-48 horas a 37°C.

Para el recuento tras preenriquecimiento de este patógeno el homogenizado antes descrito fue incubado durante 24 horas a 30°C y posteriormente 1 ml de mismo se pasó a un tubo de ensayo con 9 ml de medio Fraser 1 (Fraser, Oxoid + 1 suplemento Fraser de Oxoid por cada ½ litro de medio) de donde, tras una nueva incubación de 48 horas a 37°C, se tomó, previa agitación en vortex (Selecta), una gota de la suspensión con un asa de platino estéril, sembrándola en estría sobre Agar Cromogénico Listeria (Chromogenic Listeria Agar (ISO) Base, Oxoid). Las placas fueron incubadas durante 24-48 horas a 37°C hasta observar o descartar la presencia de colonias. Tanto para el recuento directo como para la detección se consideraron como colonias típicas de *Listeria monocytogenes* las que presentan esta morfología: colonias redondas de un característico color azul-averdoso, resultante de la actividad β-glucosidasa común a todas las especies de *Listeria*, con bordes lisos y halo opaco blanco de precipitación alrededor de la colonia debido a la

actividad de la enzima lecitinasa sobre la lecitina del medio. Para el recuento y la detección de este microorganismo se siguieron en parte las especificaciones de las UNE-EN-ISO 11290-1 Y UNE-EN-ISO 11290-2.

Por otro lado, para la detección, e identificación, de *Listeria monocytogenes* en las muestras se utilizó también la técnica de PCR sobre los caldos de enriquecimiento de Fraser ½ obtenidos según se ha descrito en los párrafos anteriores.

Dado que el caldo Fraser contiene esculina, un agente que puede interferir en el desarrollo y revelado de la PCR, el primer paso de esta nueva identificación consistió el pase de 1 ml de este caldo a un tubo de ensayo con 9 ml de TSB+0,6%EL (Tryptone Soya Broth, Oxoid + 6 g/l de Extracto de Levadura, Cultimed), siendo incubados los tubos a 37°C durante 24-48 horas, dependiendo del crecimiento en los mismos. A este caldo lo denominaremos caldo A. De estos tubos se realizaron siembras en superficie de 0,1 ml sobre placas de Agar Cromogénico Listeria (Chromogenic Listeria Agar (ISO) Base, Oxoid), que fueron incubadas entre 24-48 horas, en función del crecimiento, a 37°C. Tras la incubación, las colonias azul-verdosas sospechosas de ser *Listeria monocytogenes*, con o sin halo, fueron picadas con asas de platino estéril y depositadas en tubo de ensayo con 9 ml de de TSB+0,6%EL (Tryptone Soya Broth, Oxoid + 6 g/l de Extracto de Levadura, Cultimed). Dichos tubos fueron incubados 24 horas, a veces 48 horas, a 37°C y los denominaremos caldo B.

Sobre alícuotas de los caldos A y B fue realizada la técnica de PCR con un protocolo parecido al detallado previamente para *Clostridium botulinum*, también compuesto de tres etapas, al que nos referiremos como PCRCb cuando se haga una referencia al mismo.

Preparación de la muestra: se realizó el mismo procedimiento descrito para PCRCb con la diferencia de que sólo se realizaron dos lavados para el caldo A y uno para el caldo B.



Amplificación del material genético: En esta etapa se utilizaron las mismas proporciones de reactivos descritas en PCRCb. La diferencia respecto a dicho apartado está en los cebadores utilizados. Para la amplificación de material genético específico de *Listeria monocytogenes* fueron utilizados los cebadores descritos por Ferrer *et al.*, 1991 (tabla II.III.) que amplifican un segmento de 234 pares de bases del gen de la  $\alpha$ -hemolisina.

**Tabla II.III. Cebadores utilizados en la técnica de PCR para la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en las muestras a estudio.**

Nombre	Secuencia (5'-3')	Fragmento amplificado	Referencia
LM-1	5'-CGG AGG TTC CGA AAA GAT G-3'	234 bp de un gen de $\alpha$ -hemolisina	Furrer <i>et al.</i> , 1991
LM-2	5'-CCT CCA GAC TAGA TCG ATG TT-3'		

En este ensayo se utilizó: un control de reactivos, el blanco tal y como es descrito en PCRCb, y controles negativos y positivos de la amplificación. Para el control negativo se utilizó el material genético, extraído siguiendo el mismo procedimiento descrito en PCRCb, de un cultivo puro de *Listeria innocua* n.º 910 de la CECT y para el control positivo el material genético, extraído igual que el anterior, de un cultivo puro de *Listeria monocytogenes* n.º 4032 de la CECT.

Los eppendorf con las muestras y los controles preparados fueron introducidos en el termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) utilizando el siguiente programa de amplificación del material genético:

- un ciclo de 94°C durante 3 minutos para la desnaturalización de doble hélice de ADN
- 30 ciclos que constan de las siguiente etapas: 92°C 30 segundos (desnaturalización), 58°C 30 s (para la hibridación específica de los primers con las hebras sencillas de ADN) y 72° un minuto (elongación del amplicón)
- un ciclo de 72°C un minuto para completar los amplicones generados

La detección de los amplicones generados fue llevada a cabo según protocolo descrito para PCRCb con la diferencia de que el agente de tinción usado

es GelRed (Biotium), 5 µl del cual fueron añadidos al gel de agarosa tras su ebullición, como sustituto del baño durante 15 minutos en bromuro de etidio.

En la tabla II.IV. se hace un resumen todos los métodos de aislamiento y detección descritos en este capítulo.

**Tabla II.IV. Medios de cultivo usados, tipos de siembra, condiciones de incubación, métodos y referencias utilizadas para cada uno de los microorganismos estudiados.**

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones	Referencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird Parker (Oxoid)	37°C/48 horas	Lancette y Bennet, 2001
<i>Salmonella</i> spp.	XLD	37°C/24-48 horas	UNE-EN-ISO 6579:2002 Andrews/Hammack, 2007
	TPGY	30°C/5 días	FDA, 2001
<i>Clostridium botulinum</i>	Sobre caldo TPGY técnica de PCR		Campbell <i>et al.</i> , 1993
	Cromogénico Listeria	37°C/24-48 horas	UNE –EN-ISO 11290-1 y UNE –EN-ISO 11290-2
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sobre caldo Fraser ½ técnica de PCR		Furrer <i>et al.</i> , 1991

### II.2.3. Caracterización

Cada una de las cepas aisladas de colonias fue sometida a las siguientes pruebas con el fin de llegar a su identificación:

1. Tinción por el método Gram: Se siguieron la especificaciones de Harrigan y McCance, 1976, mediante la cual tras la tinción las bacterias Gram negativas presentan una coloración roja o rosada, mientras que las Gram positivas aparecen de color azul oscuro o púrpura.

2. Actividad catalasa: unas gotas de peróxido de hidrógeno (Panreac) al 3% se vierten directamente sobre las colonias escogidas. La aparición rápida y continuada de burbujas se considera positiva (Cowan, 2004).

3. Citocromo oxidasa: con una asa de platino en condiciones de esterilidad se pica una colonia bien aislada y se aplica sobre la zona reactiva de una tira de ensayo que contiene bicloruro de N, N-dimetil-1, 4-fenil-diamonio 0,1  $\mu\text{mol}$ ; 1-naftol 1,0  $\mu\text{mol}$  del test Bactident<sup>®</sup> Oxidasa (Merk). Al contacto de la misma en, aproximadamente, 20-60 segundos aparece una moderada o intensa coloración azulada o violeta azulado si el microorganismo a caracterizar es citocromooxidasa positivo.

#### II.2.4. Identificación

Para proceder a la confirmación de los aislamientos realizados, se llevaron a cabo los siguientes sistemas de identificación sobre las colonias sospechosas de pertenecer a los siguientes grupos microbianos a estudio:

***Staphylococcus aureus***: Generalmente, se acepta como característica de identificación de *Staphylococcus aureus* su capacidad de producción de coagulasa libre y ligada o “factor de agregación” (Kloos y Lambe, 1991). La presencia de este factor de agregación puede detectarse de diferentes modos, habiendo sido elegido para este fin el *Staphylase test* de Oxoid, que detecta la presencia del factor de agregación por agregación de eritrocitos de oveja sensibilizados con fibrinógeno sobre colonias previamente caracterizadas como cocos Gram-positivos y catalasa-positivos. La prueba se realizó picando por medio de asa estéril dos o tres colonias sospechosas, por muestra positiva, que se extendieron sobre un círculo de prueba y el de control de la tarjeta de reacción. Posteriormente se añadió una gota de reactivo prueba a un círculo y otra gota del reactivo control al otro. Con el asa de cultivo se mezclaron los contenidos de los círculos con las gotas considerándose como prueba positiva la aparición de agregación de la suspensión celular mientras se mezcla, en ausencia de agregación en el control.

***Salmonella spp.***: Para esta prueba se usó el test de aglutinación *Salmonella latex test* (Oxoid) donde un amplio rango de antígenos flagelares de *Salmonella* son usados para la producción, en conejos, de un antisuero polivalente del cual se obtienen los anticuerpos purificados que se unen a partículas de látex, sirviendo como indicadores de la posible presencia de *Salmonella*. El protocolo de dicha

prueba consistió en picar al azar tres de las colonias, por muestra, con morfología característica de *Salmonella*, aisladas según el método descrito en el apartado II.2.2., siendo consideradas como posibles salmonellas aquellas a las que tras añadirle el reactivo se observó, en los dos minutos posteriores, aglutinación y en ausencia de aglutinación de las mismas con el reactivo control.

Posteriormente las cepas positivas al test de coagulación fueron confirmadas por identificación bacteriana mediante galerías miniaturizadas API 20E (bioMérieux).

***Listeria monocytogenes***: Para la identificación de este microorganismo la técnica de PCR descrita en el apartado II.2.2. también sirve como método de identificación.

***Clostridium botulinum***: Para la identificación de este microorganismo la misma técnica de PCR descrita en el apartado II.2.2. sirve como método de identificación, dada su especificidad.

### II.2.5. Análisis estadístico

Todos los datos obtenidos fueron tratados estadísticamente mediante el programa Excel de Windows y el programa Statistica 7.

### II.3. Resultados del aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Clostridium botulinum*.

Los resultados obtenidos para el aislamiento e identificación de los patógenos se recogen a continuación agrupados para cada microorganismo.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos para el aislamiento de ***Staphylococcus aureus***, la presencia de este microorganismo fue detectada en todos los tipos de productos en que se clasificaron las muestras analizadas. En la tabla II.V. se recogen las medias de los recuentos obtenidos para cada clase de producto cárnico junto con el porcentaje de no detectados, más un tratamiento estadístico de los datos.

**Tabla II.V. Resultados de los análisis microbiológicos de *Staphylococcus aureus* en productos cárnicos elaborados y comercializados en Castilla y León.**

Producto	TMP	MR	DE	Máximo	Mínimo	% ND
<b>Chorizo</b>	8	<b>4,93</b>	0,66	5,98	4,16	<b>68</b>
<b>Salchichón</b>	6	<b>4,41</b>	1	6,06	4,26	<b>66,7</b>
<b>Jamón</b>	8	<b>4,05</b>	1,13	6,15	2,69	<b>57,9</b>
<b>Cecina</b>	3	<b>3,88</b>	1,44	5,52	2,81	<b>81,2</b>
<b>Lomo</b>	13	<b>4,57</b>	1,24	6,88	3,00	<b>27,8</b>

TMP: Total de muestras por producto donde fue detectada la presencia de *S. aureus*; MR: Media de los recuentos de *S. aureus* en cada tipo de producto. DE: Desviación Estandar; %ND: porcentaje de no detectados en cada tipo de producto.

Para la identificación, de las **39 muestras** en las que se aislaron colonias sospechosas de pertenecer a *Staphylococcus aureus*, en todas ellas, Gram-positivas y catalasa-positivas, la identificación mediante el *Staphylase Test* (Oxoid) resultó positiva.

Dado que su presencia fue detectada en numerosas muestras se decidió hacer un tratamiento estadístico de aquellas muestras positivas a la presencia de *Staphylococcus aureus* utilizando los datos físico-químicos y microbiológicos generales obtenidos en el capítulo I, y relacionándolo con los valores generales también obtenidos en ese mismo capítulo. No se observaron diferencias significativas entre ambos valores, como puede comprobarse en la tabla II.VI.

**Tabla II.VI. Relación entre valores medios de parámetro físico-químicos y microbiológicos del total de muestras y de las muestras positivas a *Staphylococcus aureus* para cada tipo de producto.**

Prod		N.º muestras	N.º env	N.º lonch	pH	a <sub>w</sub>	Sal	MAMV	MP
CH	Total	25	16	12	5,12	0,86	1,86	8,74	8,38
	Staph	8	4	3	5,11	0,83	2,18	8,6	8,29
SA	Total	18	9	9	5,13	0,85	2,54	8,31	8,05
	Staph	6	2	2	5,05	0,86	2,57	7,82	8,57
JA	Total	19	12	17	5,71	0,89	2,95	4,47	4,58
	Staph	8	5	5	5,74	0,88	3,25	4,59	4,52
CE	Total	16	13	11	5,83	0,90	3,04	6,70	6,23
	Staph	3	3	1	6,13	0,89	2,44	5,80	5,88
LO	Total	18	10	15	5,72	0,90	1,33	7,61	7,35
	Staph	13	6	10	5,66	0,91	2,68	7,73	7,77

Prod: Producto; CH: chorizo; SA: salchichón, JA: jamón; CE: cecina; LO: lomo; N.º muestras: n.º total de muestras analizadas de cada producto (Total: datos y medias de los parámetros del total de muestras analizadas de cada producto, Staph: positivas a la presencia de *Staphylococcus aureus*); N.º env: n.º muestras envasadas; N.º lonch: número de muestras loncheadas; valores medios de pH, a<sub>w</sub> y sal; MAMV y MP: valores medios de microbiota aerobia mesófila viable y microbiota psicrotrofa.

Respecto al aislamiento de *Salmonella* spp. en las muestras analizadas, mediante la técnica de enriquecimiento en dos etapas descrita en los métodos microbiológicos se aislaron colonias sospechosas en **24 de las muestras**, de las cuales finalmente **nueve se caracterizaron** mediante el *Salmonella latex test* (Oxoid), incluidas algunas colonias dudosas. De estas **cuatro se confirmaron** mediante API 20E (bioMérieux) como *Salmonella cholerasuis* spp. Arizonae.

Las cuatro muestras donde fue identificada la presencia de *Salmonella* spp. corresponden a muestras de chorizo y de salchichón, ninguna de ellas de producto envasado, dos de ellas corresponden a un chorizo y un salchichón loncheado en tienda de los mismos productos positivos a *Salmonella* spp. en corra y todas del mismo productor.

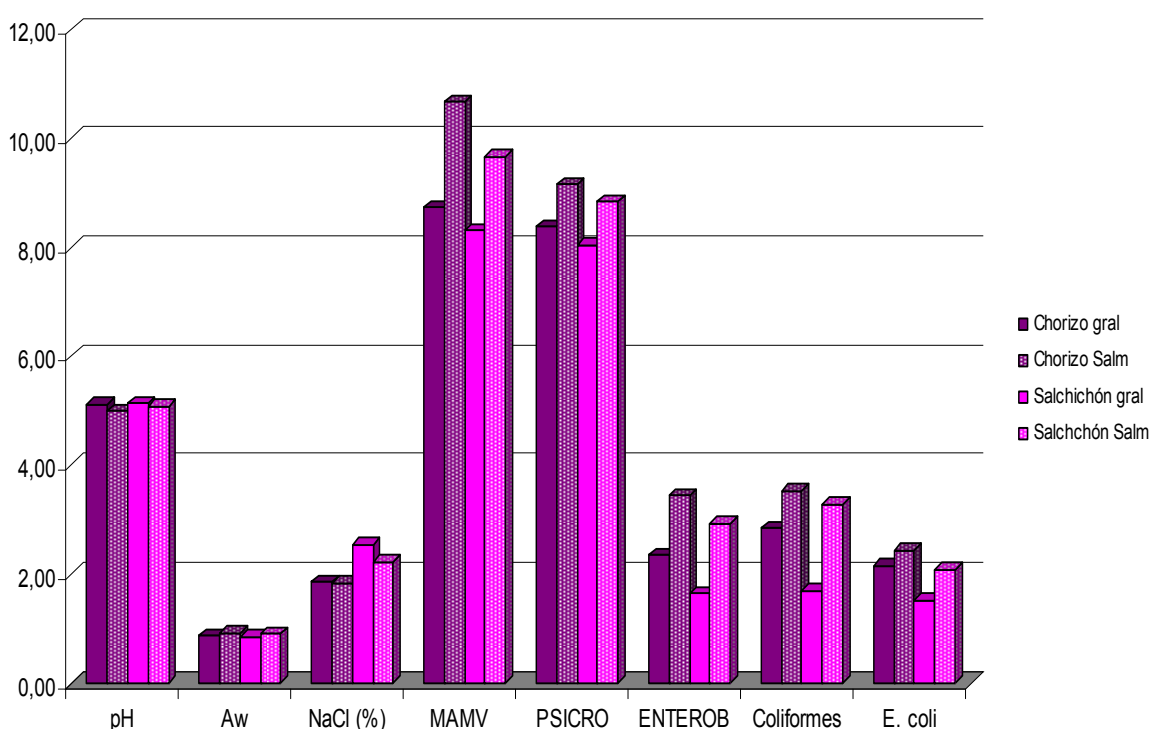
Por otro lado, los datos de las características físico-químicas y microbiológicas de las muestras positivas a la presencia de *Salmonella* spp. en relación a las características generales de las muestras de chorizo y salchichón analizadas quedan recogidas en la tabla II.VII. y gráficamente en la figura II.II

**Tabla II.VII. Relación entre valores medios de parámetro físico-químicos y microbiológicos del total de muestras y de las muestras positivas a *Salmonella* spp.**

Prod		pH	a <sub>w</sub>	Sal	MAMV	MP	ENT	COLI	<i>E. coli</i>
CH	MG	5,12	0,86	1,86	8,74	8,38	2,35	2,84	2,15
	Salm	<b>5,00</b>	<b>0,93</b>	<b>1,83</b>	<b>10,68</b>	<b>9,17</b>	<b>3,45</b>	<b>3,53</b>	<b>2,45</b>
SA	MG	5,13	0,85	2,54	8,31	8,05	1,64	1,69	1,52
	Salm	<b>5,09</b>	<b>0,90</b>	<b>2,23</b>	<b>9,68</b>	<b>8,84</b>	<b>2,93</b>	<b>3,29</b>	<b>2,09</b>

Prod: producto; MG: medias de los parámetros para el total de muestras analizadas de cada producto; Staph: medias de los parámetros para las muestras de producto donde se detectó e identificó la presencia de *Salmonella* spp. CH: chorizo; SA: salchichón; MAMV: microbiota aerobia mesófila viable; MP: microbiota psicrotrofa; ENT: enterobacterias; COLI: coliformes

**Figura II.II. Relación entre valores medios de parámetro físico-químicos y microbiológicos del total de muestras y de las muestras positivas a *Salmonella* spp.**



Gral: medias de los parámetros para el producto; Salm: medias de los parámetros para las muestras de producto donde se detectó e identificó la presencia de *Salmonella* spp. MAMV: microbiota aerobia mesófila viable; MP: microbiota psicrotrofa; ENT: enterobacterias; COLI: coliformes

Relativo al aislamiento de *Listeria monocytogenes* en los productos cárnicos muestreados, mediante la técnica descrita en el apartado II.2.2. se aislaron **colonias sospechosas** de pertenecer a esta especie en **14 de las muestras** analizadas, siete de ellas de morfología dudosa.

La relación entre los parámetros físico-químicos y microbiológicos generales y los observados en las muestras positivas a *Listeria monocytogenes* se recogen la tabla II.VIII.

Respecto a la identificación mediante la técnica de PCR descrita en el apartado II.5.2. se detectó e identificó la presencia de *Listeria monocytogenes* en **cinco de las muestras analizadas**. Con esta técnica se ha detectado la presencia de *Listeria monocytogenes* directamente desde el enriquecimiento de 1ml de caldo Fraser ½ en TSBEL6%, caldo A (ver apartado II.2.5.2.) en dos de las muestras, y en el caldo B (desde colonias sembradas del caldo A) en tres de las muestras. De las cinco muestras identificadas por PCR se ha conseguido recuperar la cepa en todas las muestras menos en la dos.

Los resultados obtenidos en la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* sobre las muestras analizadas quedan recogidos en la tabla II.VIII.

**Tabla II.VIII. Resultados de la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* mediante la aplicación de PCR a las muestras analizadas.**

N.º muestra	Prod	PC	PCR Lm Caldo A	PCR Lm Caldo B
2	Sa	P/E	+	-
10*	Ch	L	-	+
74	Ce	L/E	-	+
75	Ce	L/E	-	+
86	Lo	L/E	+	+

Prod: producto; Ch: chorizo; Sa; salchichón; Ce: cecina; Lo: lomo; PC: presentación comercial; L: loncheado; E: envasado; P: pieza; Lm: *Listeria monocytogenes*; caldo A: 1ml de caldo Fraser ½ de 2008 en 9 ml de caldo TSBEL6% 24-48h a 37°C; caldo B: colonia aislada en caldo TSBEL6% tras siembra de caldo B en medio Cromogénico Listeria (Oxoid).



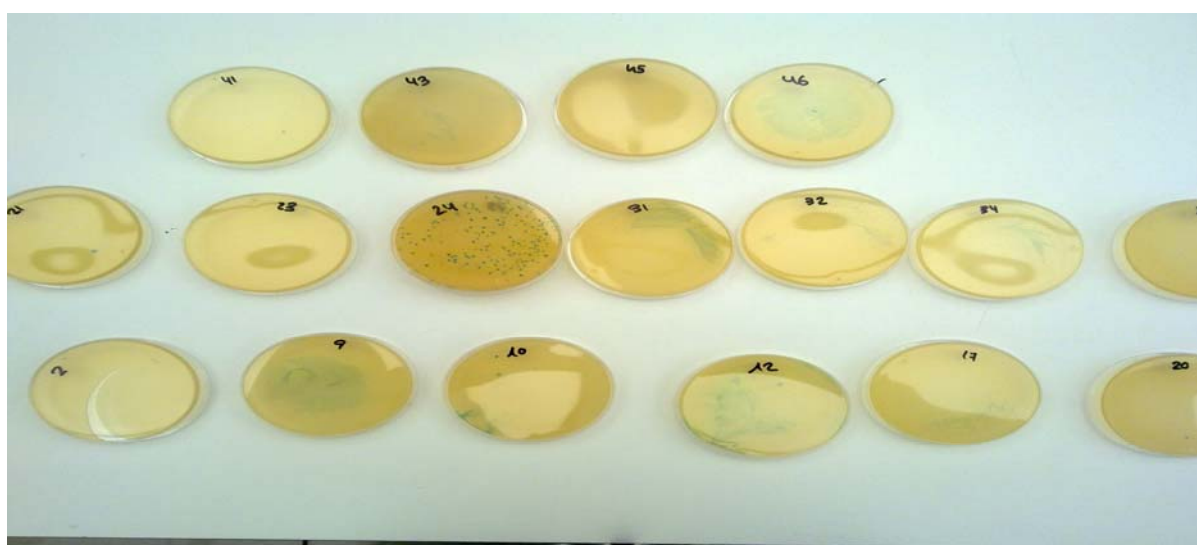
Las medias de los datos físico-químicos y microbiológicos obtenidos, tanto para cada tipo de producto cárnico en general como para las muestras positivas a *Listeria monocytogenes* en cada tipo de producto, quedan recogidos para su comparación en la tabla II.IX.

**Tabla II.IX. Relación entre valores medios de parámetro físico-químicos y microbiológicos del total de muestras y de las muestras positivas *Listeria monocytogenes*.**

Prod		pH	a <sub>w</sub>	Sal	MAMV	MP
CH	MG	5,12	0,86	1,86	8,74	8,38
	List	5	0,934	1,83	11,58	10,06
SA	MG	5,13	0,85	2,54	8,52	8,05
	List	4,89	0,883	1,82	8,73	8,46
CE	MG	5,83	0,90	3,04	6,70	6,23
	List	5,98	0,901	2,93	5,99	5,82
LO	MG	5,72	0,90	2,68	7,61	7,35
	List	6,12	0,86	3,32	8,99	6,86

CH: chorizo; SA: salchichón, JA: jamón; CE: cecina; LO: Lomo; MG: medias de los parámetros para el total las muestras analizadas para cada producto; List: medias de los parámetros para las muestras de producto donde se detectó e identificó la presencia de *Listeria monocytogenes*. MAMV: microbiota aerobia mesófila viable; MP: microbiota psicrotrofa

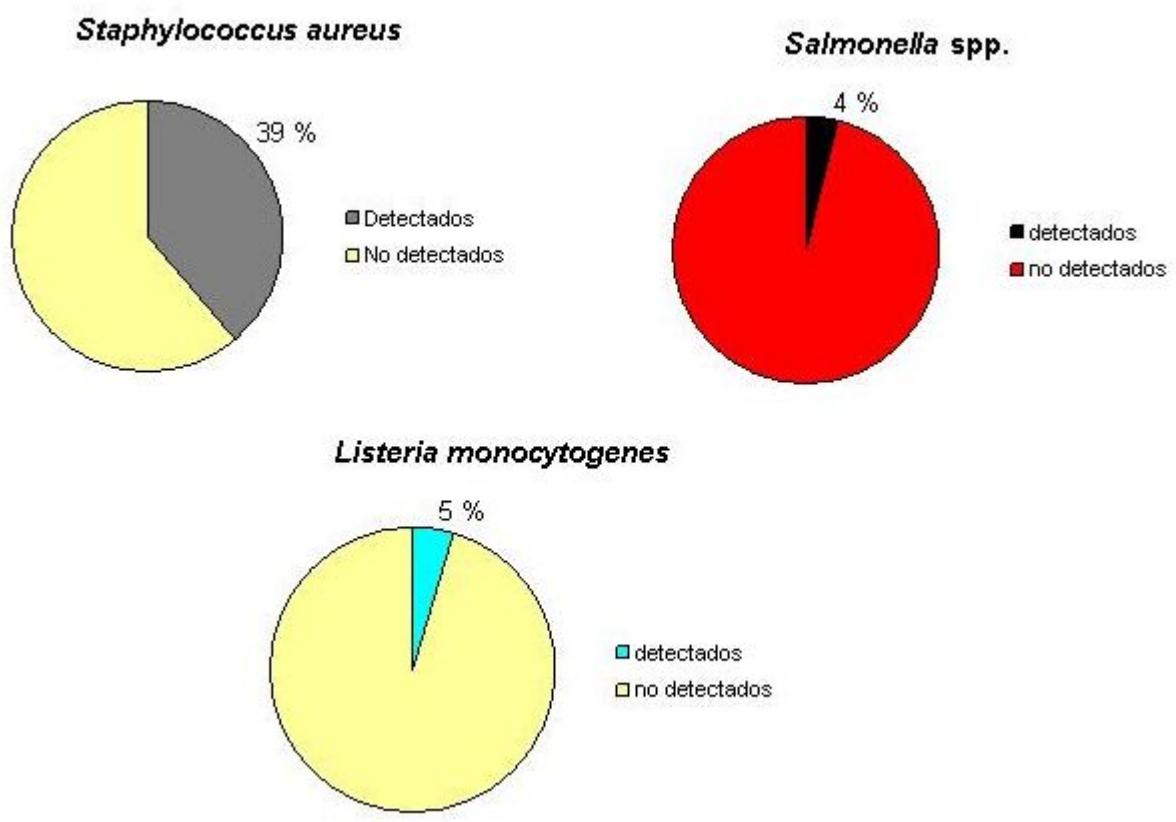
**Figura II.III. Colonias en medio Cromogénico Listeria desde caldo A.**



Todas las muestras analizadas han resultado negativas a la presencia de *Clostridium botulinum* mediante la técnica de PCR desarrollada por el protocolo descrito en apartado II.2.2.

Por último, en la figura II.III. se ofrece un resumen de los porcentajes de microorganismos patógenos detectados respecto al total de muestras.

**Figura II.IV. Porcentajes de patógenos identificados por técnicas inmunológicas o bioquímicas respecto al total de las muestras analizadas.**



## II.4. Discusión.

### II.4.1. Discusión de los resultados sobre la detección e identificación de *Staphylococcus aureus* en los productos cárnicos analizados

Por lo que respecta a la detección e identificación de *Staphylococcus aureus* en las muestras analizadas los resultados indican que este microorganismo estaba presente en 39 de las 100 muestras analizadas, habiendo sido detectado en todos los tipos de productos cárnicos, chorizo, salchichón, jamón, cecina y lomo (tabla II.V.).

Como ya ha sido comentado en la introducción de este capítulo, *S. aureus* es una de las bacterias patógenas no esporuladas más resistentes, por lo que su presencia es habitual en el ambiente y fácilmente puede contaminar los alimentos. Esta característica del mismo, unido al hecho de que se calcula que, aproximadamente, el 30% de la población sana es portadora de este microorganismo (Forsythe, 2000), hace que su **presencia** sea muy habitual, habiendo sido detectado en una gran cantidad de alimentos comerciales por muchos investigadores (Jay, 2002).

Por lo que se refiere a la presencia de *Staphylococcus* en **embutidos cárnicos**, hay que matizar que este género se usa normalmente en los cultivos iniciadores o estárter empleados en la elaboración de este tipo de productos fermentados (Ruiz-Moyano *et al.*, 2011), siendo el más frecuente, correspondiendo hasta el 60% de los miembros de *Micrococcaceae* aislados, *Staphylococcus xylosum* (Martín *et al.*, 2007). Este matiz resulta importante si tenemos en cuenta que el medio de aislamiento usado en este estudio permite la recuperación de este microorganismo y de *S. aureus*, lo que supone trabajar con elevados recuentos de microorganismos parecidos que pueden interferir en los resultados observados.

En concreto, en embutidos cárnicos como el chorizo o el salchichón, *S. aureus* está presente en el 32 y 33,3%, respectivamente, de las muestras analizadas. La bibliografía al respecto recoge que en estos productos, típicamente españoles, la presencia de estafilococos coagulasa positivos es

también bastante frecuente y así ha sido afirmado por diversos autores, como Lafarga *et al.*, 1986; Sanz *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1982 y 1984. Otros investigadores en estudios más recientes han aislado *S. aureus* en este tipo de productos fermentados (Coppola *et al.*, 2000) o en un tipo de embutido tradicional griego (Drosinos *et al.*, 2005) pero en menores porcentajes.

En estudios previos Martín *et al.*, 2007, sobre la caracterización de miembros de la familia *Micrococcaceae* aislados de *Iberian dry-cured sausages*. Observaron que aproximadamente en el 40% de los aislamientos de esta familia, para uno de los elaboradores estudiados, correspondía a *S. aureus*, mientras que este microorganismo no estaba presente en los embutidos de otro elaborador, lo que achacan a la distribución ambiental de este microorganismo y a la influencia de las prácticas higiénicas de la empresa.

En contraposición a esta presencia relativamente frecuente de *S. aureus* en embutidos fermentados, otros autores como Gomi *et al.*, 2005 y González y Díez, 2002, en sus estudios sobre este tipo de productos indican que *S. aureus* no ha sido aislado en ninguna de las muestras analizadas.

En relación a la presencia de *S. aureus* en **salazones cárnicas** como el jamón, éste está presente en el 42,1% de las muestras analizadas, porcentaje ligeramente superior a los observados para el salchichón y el chorizo (tabla II.V.).

En este tipo de producto si hay documentados brotes asociados a este microorganismo, como los ya referidos por CDC, 1983 y Uterman y Müller, 1992 por lo que sí es un posible contaminante de este tipo de producto y en el mismo se pueden dar las condiciones para la producción de la toxina. Sin embargo, en la mayoría de las publicaciones consultadas en las que se estudiaba la presencia de *S. aureus* en jamones, en la mayoría los recuentos estaban por debajo del límite de detección de la técnica utilizada (Fulladosa *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2010 y 2011; García-Esteban *et al.*, 2004).

Únicamente en el estudio realizado por Blesa *et al.*, 2008, sobre los cambios en las características microbiológicas del jamón al reemplazar parcialmente la sal común por otras sales, obtuvieron recuentos positivos para este microorganismo, a los 80 días de curado podían llegar a niveles de 3 log ufc/g en la parte más superficial del jamón. Un aspecto interesante es que para los jamones elaborados únicamente con sal común los recuentos observados eran menores, del orden de 1-1,5 unidades logarítmicas menor. Otro característica importante es la zona del jamón de la que se obtienen las muestras, pues siempre son mayores en las zonas superficiales de la pieza.

En el caso de la cecina, *S. aureus* no se detectó su presencia en el 81,2% de las muestras, siendo el tipo de producto donde con menor frecuencia se aisló este patógeno y además en menor cantidad cuando está presente (tabla II.V.).

En la bibliografía consultada sobre este típico producto regional no hay información sobre la presencia de *S. aureus*. Sí sobre productos, sólo relativamente, parecidos como el biltong o el charqui.

Para el primero, el biltong: un tipo de carne seca originaria de Sudáfrica que también utiliza carne de vaca como materia prima, si hay estudios que indican la clara prevalencia de este microorganismo en el mismo (Mhlambi, 2008). También se ha realizado una investigación sobre la supervivencia de *S. aureus* enterotoxigénico durante el proceso de elaboración del biltong, donde se aíslan hasta 2-4 log ufc/g en el producto final, con el consiguiente riesgo de intoxicación que esto implicaría (Naidoo y Lindsay, 2010).

Para el segundo, el charqui (originario de América del Sur, que consiste carne de vacuno deshidratada, salada y expuesta al sol), existen también estudios que indican que ha sido aislado en este tipo de producto (Pinto *et al.*, 1998). Al igual que para el biltong, también se ha realizado un ensayo sobre la supervivencia de *S. aureus* durante el proceso de elaboración que logra sobrevivir en el producto final, con un 0,70-0,75 de actividad de agua se crean las condiciones disgenésicas para impedir su desarrollo (Lara *et al.*, 2003).

De acuerdo con la bibliografía consultada y a tenor de nuestros resultados, concluimos que la presencia de *S. aureus* en la cecina también puede considerarse frecuente, al igual que en el resto de productos analizados.

Por lo que respecta al lomo, *S. aureus* ha sido aislado en el 72,2% de las muestras, lo que indica que es el tipo de producto, de los analizados en este estudio, donde la presencia de este microorganismo es más habitual.

Sobre el lomo sí que se han realizado estudios que investigan la presencia de este patógeno en el mismo que indican que la prevalencia de estafilococos coagulasa positivos es bastante alta, siendo detectados en el 33% de las muestras, aunque en todos ellos el nivel más alto siempre ha estado por debajo de  $10^3$  ufc/g (Aliño *et al.*, 2009 y 2010), lo cual disminuye el riesgo de la posible producción de la toxina.

Por lo que respecta a la prevalencia de este microorganismo en el lomo, nuestro estudio y los anteriormente citados parecen indicar que ésta es bastante elevada, y aunque los recuentos observados por nosotros son una unidad logarítmica mayores que los detectados por Aliño *et al.*, 2009 y 2010, en general, son también bastante elevados respecto a otros productos cárnicos evaluados.

En lo relativo a los **recuentos** medios obtenidos en nuestro estudio para el chorizo y el salchichón, 4,93 y 4,41 log ufc/g respectivamente (tabla II.V.), éstos son relativamente elevados, aunque de acuerdo con los estándares aportados por la FDA (<http://www.cfsa.fda.gov/~mow/chap3.html.Food>) son necesarios niveles de más de  $10^5$  ufc/g para producir intoxicación, lo cual no sucede en ninguno. Por otro lado, como ya fue comentado en la introducción de este capítulo, aunque *S. aureus* pueda tolerar las condiciones ambientales generadas en este tipo de productos, parece demostrado que las condiciones de acidez generadas por la flora ácido-láctica interfieren notablemente en la síntesis de toxina.

En el caso de las salazones cárnicas los recuentos medios observados son 4,05 log ufc/g para el jamón, 3,88 para la cecina y 4,57 para el lomo (tabla II.V.), niveles también por debajo de los considerados como peligrosos para la producción de la suficiente cantidad de toxina causante del cuadro clínico.

Por lo que respecta a **la relación entre la presencia de *S. aureus* en las muestras y las características físico-químicas y microbiológicas de las mismas**, como puede observarse en la tabla II.VI. no se aprecian diferencias significativas entre ambas, ni una tendencia constante en ninguno de los parámetros analizados: ph, aw, porcentaje de sal y recuentos de microbiota aerobia mesófila viable y microbiota psicrotrofa.

A este respecto también es considerado oportuno indicar que la presencia de *S. aureus* ha sido detectada en productos con una actividad de agua menor a 0,87, en varias de las muestras, mayoritariamente de chorizo, indicada por Notermans y Heuvelman, 1983 (Stewart *et al.*, 2002) como el límite de crecimiento para este microorganismo.

Por otro lado, como figura en la tabla II.V. la presencia de *S. aureus* se detecta en todos los tipos de productos, envasados o no, en pieza o loncheados, sin que existan diferencias significativas entre las distintas presentaciones.

#### **II.4.2. Discusión de los resultados sobre la detección e identificación de *Salmonella* spp. en los productos cárnicos analizados**

La presencia de *Salmonella* spp. ha sido detectada en cuatro muestras de las 100 analizadas, que se corresponden con dos tipos de productos cárnicos, el salchichón y el chorizo, tras un enriquecimiento siguiendo el protocolo indicado en el apartado II.2.2. Se considera oportuno indicar que se corresponden únicamente a dos productos, ya que en ambos casos, para el chorizo y para el salchichón, el producto en lonchas es el loncheado en tienda del producto en sarta.

El aspecto más importante de la **detección** de *Salmonella* spp. en los productos cárnicos analizados es que incumple la normativa vigente, los reglamentos 2073/2005, 1441/2007 y 365/2010 relativos a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, que obligan a *su ausencia en 25 gramos de producto cárnico destinado a ser consumido crudo, excluidos los productos en los que el proceso de fabricación o la composición del producto elimine el riesgo, durante la comercialización, dentro de su vida útil.*

Los reglamentos están basados en la determinación formal del riesgo y en principios internacionalmente aceptados, y *Salmonella* spp. supone un riesgo real en los productos cárnicos, ya que éstos han sido asociados en numerosos brotes de salmonelosis. Dentro de los productos cárnicos, los embutidos, con relativa frecuencia, se ha visto implicado en brotes de salmonelosis, especialmente el salami (CDD, 2010).

Existe un interesante estudio realizado por Gormley *et al.*, publicado en 2010, que evalúa la seguridad microbiológica de productos cárnicos RTE en los mercados de UK, focalizado especialmente en *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes*, muy útil en relación a la presente discusión. Es el mismo tras un análisis de 2359 muestras se detectó la presencia de *Salmonella* (*S. Unnamed*; *S. Thyphimurium* y *S. Derby*) en 3 de las muestras analizadas, en concreto 2 muestras de chorizo y 1 de salami, lo que supone el 0,1% de las muestras analizadas, un porcentaje bastante inferior al observado en nuestro estudio, un 2% si tenemos en cuenta que sólo se detectó en 2 productos y no en 4 muestras.

Por lo que respecta a las investigaciones realizadas sobre la presencia de *Salmonella* spp. en chorizos y salchichones, este microorganismo suele estar ausente en la mayoría de los estudios donde se incluye su detección (Drosinos *et al.*, 2005; Comi *et al.*, 2005). Sólo en una de las publicaciones consultadas, Casquete *et al.*, 2012, se detecta la presencia de este patógeno durante el proceso de elaboración en los primeros días del mismo y sólo en las muestras de una de las empresas analizadas. Sin embargo, *Salmonella* spp. está ausente en el producto final, chorizo, de todas las empresas evaluadas.



Por lo tanto, basándonos en lo observado en nuestro estudio y lo aportado por otros autores, concluimos que la presencia de este microorganismo en productos cárnicos es poco frecuente, pero el peligro sí es posible dado que sí ha sido detectado. Por otro lado, el gran número de muestras evaluadas donde no ha sido detectada su presencia es un buen indicador de la adecuada calidad higiénico-sanitaria de los productos cárnicos elaborados en Castilla y León.

Un aspecto destacado de este apartado es la clara **relación** existente entre los recuentos de microorganismos indicadores y la presencia de *Salmonella* spp., como puede ser observado en la figura II.II. En este gráfico se puede ver que los recuentos de microbiota aerobia mesófila viable, microbiota psicrotrofa, enterobacterias, coliformes y *E.coli* son significativamente mayores, del orden de una unidad logarítmica mayor, en los productos donde fue detectada la presencia de *Salmonella* spp. Esta observación corrobora la utilidad de estos grupos microbianos como indicadores de la calidad microbiológica de los productos alimenticios, especialmente de los tres últimos, los que corresponden a microorganismos que habitualmente viven en el tracto gastrointestinal humano y animal y que indican la contaminación directa o indirecta de los alimentos con materia de procedencia fecal.

No se han observado diferencias significativas entre las muestras positivas a *Salmonella* spp. y la media de los productos analizados en cuanto a los parámetros físico-químicos evaluados.

#### **II.4.3. Discusión de los resultados sobre la detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en los productos cárnicos analizados**

La presencia de *Listeria monocytogenes* fue detectada en varias de las muestras analizadas, **cinco** mediante la técnica de PCR descrita en el apartado II.2.5.2.

El primer aspecto importante de la detección de *Listeria monocytogenes* en las muestras analizadas en este estudio es que ninguna de ellas incumple la normativa que regula su presencia: los reglamentos 2073/2005, 1441/2007 y 365/2010 relativos a los criterios microbiológicos aplicables a los productos

alimenticios. Esta legislación sólo fija *un límite de 100 ufc/g en alimentos listos para su consumo que pueden, o no, favorecer el desarrollo de Listeria monocytogenes, que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales, límite aplicable a la fase de comercialización durante su vida útil.* No incumple esta legislación dado que en las muestras fue detectada su presencia tras un enriquecimiento previo.

Con estos niveles de detección, poco frecuentes y siempre por debajo del límite legal, 100 ufc/g, podríamos afirmar que los alimentos analizados no suponen un riesgo sanitario en relación a *Listeria monocytogenes*. Dicha afirmación la realizamos basándonos en la dosis infectiva mínima que se puede inferir de los datos publicados en relación a la carga microbiana de los alimentos responsables de brotes de listeriosis, tanto epidémicos como esporádicos, donde los recuentos habitualmente son superiores a 100 ufc/g (Swaminathan, 2007). Incluso se puede afirmar que la dosis infectiva es relativamente alta, de al menos  $10^5$ - $10^7$  ufc/g (Capita-González, 1997).

Pero esta afirmación de seguridad de los alimentos analizados respecto a *Listeria monocytogenes* no puede ser rotunda, dado que, como se comenta en el apartado IV.1., hay documentado un brote en Estados Unidos en 1998 causado por salchichas tipo frankfurt contaminadas con menos de 0,3 ufc/g de *Listeria monocytogenes* (Mead, 2006). Aunque, al respecto hay que tener en cuenta el tiempo transcurrido entre la intoxicación y el análisis del alimento, que puede haber permitido tanto el crecimiento como la muerte del microorganismo, y la fiabilidad de los procedimientos de recuento, que pueden interferir en el resultado obtenido.

Gormley *et al.*, 2010, evalúa la presencia de *Listeria monocytogenes* específicamente en productos cárnicos RTE comercializados en UK, donde 6 de las 2359 muestras analizadas están contaminadas con niveles inaceptables de este microorganismo. Este es un matiz importante, pues según este estudio esas 6 muestras presentaban recuentos entre  $2,2 \cdot 10^2$  y  $1,5 \cdot 10^6$  ufc/g, lo que supera claramente, en algunos casos, la dosis infectiva más elevada citada en el párrafo anterior, y, por supuesto, el límite legal para aceptar su presencia en

el mercado. Los productos contaminados correspondían a bacon curado, salami, rollos de oreja y lengua y un tipo de embutido húngaro. En este estudio no se recoge el número de muestras en las que fue detectada la presencia de *Listeria monocytogenes* por debajo de los límites legales.

Un segundo aspecto importante respecto a la presencia de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos sería comparar los porcentajes de su presencia observados por nosotros en productos cárnicos con los resultados obtenidos por otros autores sobre el mismo tipo de alimentos.

En relación a los productos cárnicos en general, en una publicación de la EFSA y ECDC de 2009 se recoge que la incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos comercializados en la Unión Europea es el 1,8, el 2,2 y 2,5% en función del origen de la carne, vacuno, porcino y otras carnes rojas sin especificar, respectivamente, lo que reflejaría el moderado incremento de las notificaciones de este microorganismo en el ámbito de la Unión Europea observado por estos organismos, lo que indica unos porcentajes inferiores al observado por nosotros.

Por otro lado, en nuestro estudio hemos detectado e identificado la presencia de *Listeria monocytogenes*, en casi todos los tipos de productos cárnicos analizados excepto en el jamón, por lo tanto se realizará a continuación una breve discusión para cada grupo de productos.

En el caso de los embutidos cárnicos, hay documentados bastantes brotes de listeriosis asociados a este tipo de productos como el acontecido en Chile en 2009 (Nación, 2009), en Estados Unidos (Schawtz *et al.*, 1989) o Europa (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). Por otro lado en nuestro estudio, hemos detectado la presencia de *Listeria monocytogenes* en una muestra de chorizo y en otra de salchichón. En conjunto esto indica que los embutidos pueden ser vehículos de este microorganismo.

También en el trabajo realizado por Casquete *et al.*, 2012, la presencia de *Listeria monocytogenes* fue detectada en el control realizado en la misma

industria de elaboración del chorizo, aunque no en el producto final. Pero resulta de especial interés el hecho de que esta industria es también la positiva a la presencia de *Salmonella* spp. en sus productos, como fue indicado en el apartado anterior. Esta coincidencia también fue observada en nuestro estudio, ya que las muestras de chorizo positivas a *Salmonella* spp. también son positivas a *Listeria monocytogenes*, lo que ser una señal clara de las deficientes condiciones higiénicas de la empresa elaboradora.

Bastante mayor es la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en embutidos fermentados italianos observada por De Cesare *et al.*, 2007, que recogen en su estudio que este patógeno está presente en el 15,2% de las muestras evaluadas, aunque, sin embargo, los recuentos siempre están en valores por debajo de 10 NMP/g (número más probable por gramo), por debajo del límite legal. Otro aspecto notable es que la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en embutidos frescos es notablemente mayor, el 38,9%, y los recuentos también, un 20% de ese 38,9% son mayores de 100 nmp/g, que en los embutidos fermentados.

Este último aspecto viene a corroborar lo observado por Benkerroum *et al.*, 2003, en su estudio sobre el comportamiento de *Listeria monocytogenes* en un embutido cárnico fresco, merguez, en el cual la presencia de bacteriocinas producidas por un cultivo de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* reduce notablemente los recuentos durante la fermentación del mismo, confirmando el efecto protector de la fermentación.

Por otro lado, también hay estudios publicados donde se notifica la ausencia de *Listeria monocytogenes* en las muestras de embutido analizadas (Comi *et al.*, 2005).

Sobre la presencia de *Listeria monocytogenes* en el jamón, en nuestro estudio no ha sido detectada su presencia en las muestras de jamón analizadas. Sin embargo, existen estudios que documentan su detección en este tipo de producto, como el publicado por FSIS en 2002, aunque la mayoría indican que las especiales características de actividad de agua y concentración

de sal deberían impedir su supervivencia. Este último aspecto viene a ser corroborado en las publicaciones consultadas sobre el jamón, ya que este patógeno está ausente en todas las muestras analizadas (Fulladosa *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2010 y 2011; Blesa *et al.*, 2008; García-Esteban *et al.*, 2004).

Por lo que respecta a la cecina, la presencia de *Listeria monocytogenes* fue detectada en dos de las muestras analizadas, siendo este el producto con mayor porcentaje de positivos respecto a los otros tipos de cárnicos analizados. Para la cecina no existen brotes de listeriosis documentados ni estudios específicos al respecto, pero si hay documentadas prevalencias del 0,52% de este patógeno en productos como el charqui en punto de venta (Levine *et al.*, 2001).

Por último, respecto al lomo, la presencia de este patógeno sólo fue detectada en una de las muestras analizadas. El único estudio con el que se puede comparar este resultado es el realizado por Aliño *et al.*, 2009 y 2010, en el que se detecta una prevalencia de *Listeria spp.* del 17%. Esta elevada prevalencia indicaría que aunque no se haya llevado el estudio a la identificación a nivel de especie, existe un claro riesgo de la presencia de *Listeria monocytogenes*.

Otro aspecto que merece ser destacado es que los 5 productos cárnicos positivos a la presencia de *Listeria monocytogenes*, **cuatro** corresponden a **envasados**, lo que representa una diferencia claramente significativa. De estos cuatro, uno corresponde a presentación en taco y tres a loncheado (ver tabla II.VIII.).

Esta clara prevalencia, observada en nuestro estudio, de la presencia de *Listeria monocytogenes* en los productos cárnicos envasados, también se corresponde con lo observado por Gormley *et al.*, 2010, en su estudio sobre la calidad microbiológica de productos cárnicos RTE comercializados en UK, en el cual de las seis muestras con recuentos superiores al límite máximo establecido por la UE para *Listeria monocytogenes* en este tipo de productos,

cinco corresponden a productos envasados y el otro fue abierto y loncheado en tienda en el momento del muestreo.

Desde un punto de vista práctico, Benlloch, en su “Guía para la elaboración de programas de control de *Listeria monocytogenes* en la industria cárnica” de 2001, indica que, basándose en su experiencia, la fuente de contaminación microbiana de los alimentos se halla normalmente en la sala de envasado. Incluso tiene en cuenta un aspecto singular como que los lubricantes pueden contaminarse y convertirse en el medio adecuado de crecimiento de *L. monocytogenes* y por tanto en una fuente importante de contaminación. Aporta también un dato de interés práctico, como lo didáctico que resulta acercarse al taller mecánico cuando se desmonta una máquina para el mantenimiento periódico. Lo sorprendente que resulta la gran suciedad que hay y dónde acumula.

Respecto a la atmósfera de envasado hay autores, como García de Fernando *et al.*, 1995 (García-Esteban, 2004) que ya habían observado que el uso de atmósferas modificadas, vacío o en atmósfera con un 100% de N<sub>2</sub>, pueden fácilmente soportar el crecimiento de patógenos como *Listeria monocytogenes*.

Por lo que respecta a la influencia de los parámetros físico-químicos y microbiológicos sobre la presencia de *Listeria monocytogenes* en los productos cárnicos, no han sido observadas diferencias significativas entre las medias de los productos analizados y las medias de los productos positivos a la presencia de este microorganismo (tabla II.IX.). Sólo en el chorizo y el lomo se observa un aumento de los recuento de microbiota aerobia mesófila viable de las muestras positivas al patógeno respecto a las medias generales.

Especialmente interesante resulta el comportamiento de la microbiota psicrotrofa en las muestras positivas a la presencia de *Listeria monocytogenes*, pero tampoco en el comportamiento de este parámetro se observa una tendencia uniforme, pues hay productos donde se produce un pequeño

aumento de la misma, y en otros se observa una disminución, como en el caso del lomo, manteniéndose constante en la cecina (tabla II.IX).

Por todo lo observado y en comparación con las aportaciones realizadas por otros autores, concluimos que la prevalencia de la presencia *Listeria monocytogenes* en embutidos fermentados y salazones cárnicas, con recuentos por debajo del límite establecido por los reglamentos europeos vigentes al respecto, es elevada, entre el 1,8% observado por organismo europeos, el 5% observado por nosotros y hasta el 15% documentado por algunos autores. Por otro lado, también concluimos que los envasados en atmósferas modificadas de productos cárnicos parecen demostrar una mayor prevalencia de la presencia de este microorganismo en los mismos.

#### **II.4.4. Discusión de los resultados sobre la detección e identificación de *Clostridium botulinum* en los productos cárnicos analizados**

La ausencia de detección de *Clostridium botulinum* en las muestras analizadas en nuestro estudio se corresponde con lo observado por la mayoría de los autores para este microorganismo, el cual es detectado con muy poca frecuencia en este tipo de alimentos.

A modo de ejemplo que corrobora esta afirmación podemos citar un estudio realizado por Lilly *et al.* en 1996 en el cual esporas de *Clostridium botulinum* entre más de 1100 muestras comerciales de vegetales preparado y envasados sólo fueron encontradas en cuatro de las muestras analizadas.

Por otro lado, en los casos en los que además de su detección se valora también el nivel de esporas presentes, los niveles observados suelen ser muy bajos. En concreto en las carnes, objeto de estudio en este caso, se detecta en muy poca cantidad, generalmente menos de 10 esporas por kg, incluso menos de 1 espora/kg (Dobbs, 1993b) o entre 0,04 y 2,18 esporas/kg (Holley, 1981), lo que implicaría ya una baja carga inicial en la materia prima que es el componente mayoritario de este tipo de productos. Estudios más recientes, como el realizado por Carlin *et al.*, 2004, sobre la presencia de *C. botulinum* en materiales crudos utilizados para la elaboración de REPFEDs en Francia,

también concluyen que la frecuencia de la presencia de este microorganismo es baja, siendo detectado sólo en 12 de las 143 muestras de carne y pollo analizadas. Por otro lado, en este mismo estudio se estimó, por el método del número más probable, que la presencia de *C. botulinum* está entre 1 y 3 células por kilogramo de producto, del total de productos analizados. Este patógeno no fue detectado, en concreto el grupo psicrotrofo que incluye el tipo E, algunas cepas de B y F, en ninguna de las 500 muestras analizadas (Gibbs, *et al.*, 1994).

En ninguno de los estudios citados en apartados anteriores sobre las características microbiológicas de embutidos cárnicos, jamones, cecinas y lomo se hace mención a este microorganismo.

Por lo que respecta a la técnica de PCR utilizada para la detección de *Clostridium botulinum* en los productos cárnicos analizados, otros ensayos realizados sobre este microorganismo con este mismo método corroboran su eficacia, como el publicado por Hielm *et al.*, en 1995. En esta publicación sobre la detección de *C. botulinum* en pescado y muestras ambientales se afirma que las 26 muestras analizadas rindieron idénticos resultados usando la técnica de PCR que el bioensayo realizado sobre ratones, la técnica oficial. Sólo para el tipo E los resultados obtenidos sobre muestras ambientales son mejores usando unos cebadores específicos que los cebadores generales para la toxina botulínica de Campbell *et al.*, 1993, utilizados en nuestro experimento. El tipo E no es el contaminante más habitual de este tipo de productos cárnicos, dado su hábitat marino con el que está directamente relacionado.





## **CAPÍTULO III**

**Evaluación de la supervivencia de  
*Staphylococcus aureus*  
inoculado en productos cárnicos  
loncheados y envasados en distintas atmósferas**



### III.1. Introducción

El género *Staphylococcus* agrupa a bacterias Gram-positivas pequeñas y esféricas, inmóviles y no formadoras de esporas, que pueden aparecer aisladas, aunque suelen formar cadenas de tres o cuatro células y más frecuentemente racimos. Dependiendo de la especie y de las condiciones del medio de cultivo sus células pueden tener unos diámetros comprendidos entre 0,5 y 1,5  $\mu\text{m}$ . Son catalasa positivas, cuyo ADN contiene entre un 30 y un 40% de GC (Soez y Bohach, 2007). La mayor parte de las especies son anaerobias facultativas, aunque el crecimiento suele ser más rápido en presencia de oxígeno (Martín y Myers, 1994). Otras características diferenciales de *S. aureus* y de otras especies de estafilococos están resumidas en la tabla III.I.

Por lo que se refiere a su clasificación, de acuerdo con el Manual Bergey's (Scheifer, 1986) el género *Staphylococcus* está clasificado dentro de la familia *Micrococaceae*, dividido en 32 especies y subespecies. La especie tipo es *Staphylococcus aureus* (Kloos y Lambe, 1995).

**Tabla III.I. Características generales de algunas especies del género *Staphylococcus*.**

Características	<i>S. aureus</i>	<i>S. schromogenes</i>	<i>S. hyicus</i>	<i>S. intermedius</i>
Coagulasa	+	-	+	+
Nucleasa termoestable	+	-	+	+
Factor de aglutinación	+	-	-	+
Pigmento amarillo	+	+	-	-
Actividad hemolítica	+	-	-	+
Fosfatasa	+	+	+	+
Lisostafin	S	S	S	S
Hialuronidasa	+	-	+	-
Fermentación del manitol	+	+/-	-	+/-
Resistencia a novobiocina	-	-	-	-

Fuente: Doyle y Beauchat, 2007.

Si bien el papel de estos microorganismos como causantes de infecciones se conoce desde la segunda mitad del siglo XIX, la capacidad para

provocar intoxicación alimentaria del *Staphylococcus aureus* fue demostrada de modo concluyente por Barber en 1914, quien reprodujo en sí mismo los signos y síntomas de la enfermedad bebiendo leche que había sido contaminada con un cultivo de *Staphylococcus aureus*. La capacidad de algunas cepas de *S. aureus* para provocar intoxicación alimentaria fue demostrada de modo concluyente en 1930 por G.M. Dack *et al.*, quienes demostraron que se podían reproducir los síntomas por ingestión de filtrados de cultivos de *S. aureus*.

Aunque varias especies, incluidos algunos estafilococos coagulasa-negativos, tienen potencial para causar gastroenteritis (Blaiotta *et al.*, 2004), prácticamente la totalidad de los casos de intoxicación estafilocócica son atribuidos a *Staphylococcus aureus*.

La intoxicación en humanos se debe, normalmente, a la ingesta de las toxinas producidas por el microorganismo en el alimento. Los síntomas de la intoxicación suelen corresponder con los de una gastroenteritis relativamente leve en individuos sanos, cursando habitualmente con diarrea, vómitos y calambres abdominales. Suele ser una enfermedad autolimitante, cuya gravedad dependerá de la susceptibilidad de cada individuo a la toxina, la cantidad de alimento ingerida, la cantidad de toxina presente en el alimento y la salud general del individuo.

Por lo que se refiere a las toxinas producidas por *Staphylococcus aureus*, la tradicional nomenclatura alfabética de las toxinas estafilocócicas establecida en 1962 basándose en sus propiedades antigénicas sigue siendo la recomendada (Lina *et al.*, 2004) habiendo sido identificadas hasta el momento diez enterotoxinas estafilocócicas: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D, E, H, G e I (Jay, 2002; Munsos, 1998; Su, 1995). Sin embargo, hay una tendencia actual a basar la nomenclatura no sólo en sus propiedades antigénicas, sino también en base a la relación molecular con su secuencia primaria. Dentro de la nomenclatura clásica, son las enterotoxinas A, B, C y D las que con más frecuencia se ven implicadas en brotes de intoxicación alimentaria (Dinges *et al.*, 2000).

La dosis infectiva para producir un cuadro clínico es inferior a 1 µg de toxina, nivel alcanzado cuando la población de *S. aureus* supera las 10<sup>5</sup> ufc/g (ICMSF, 1996; Anonymous, 1992; Center for Food Safety and Applied Nutrition, 1992). En otros estudios se observó que en la mayoría de los brotes el rango típico de contaminación está entre 10<sup>5</sup> y 10<sup>8</sup> ufc/g del microorganismo, aunque no se tenga en cuenta que niveles menores pueden causar intoxicación (Holmberg, 1984).

Es interesante resaltar que aunque *Staphylococcus aureus* crece en un amplio rango de temperaturas, comprendidas entre 7 y 48°C, de pH, entre 4,5 y 10, y de actividad de agua, 0,87-0,99 (Stewart *et al.*, 2002; Novick, 1993), las condiciones en las que puede producir la toxina son más limitadas.

Una característica importante para entender la patogenia de este microorganismo es que, aunque el microorganismo muestra una baja resistencia a los tratamientos térmicos ( $D_{65,5}=0,2-2$  min), sus enterotoxinas sí son muy resistentes al calor (ICMSF, 1996b) y a los enzimas proteolíticos. Por lo tanto, puede darse el hecho de que el alimento involucrado en un brote de intoxicación estafilocócica no contenga el microorganismo viable, pues éste puede haber sido destruido por el tratamiento térmico, pero sí se hayan dado las condiciones necesarias para la producción de la toxina y ésta persista finalmente en el producto, ya que las temperaturas habitualmente usadas en el cocinado doméstico no destruyen las toxinas y los alimentos contaminados suelen tener una apariencia y un sabor normal (Bryan, 1988; Bergdoll, 1990)

El hecho de que *S. aureus* sea una de las bacterias patógenas no esporuladas más resistentes, pudiendo mantenerse en el medioambiente en estado latente durante largos periodos de tiempo, hace que sea uno de los patógenos de transmisión alimentaria que más fácilmente puede contaminar los alimentos. Esta característica, unida al hecho de que aproximadamente un 30% de la población sana es portadora de *S. aureus* (Forsythe, 2000), hace esperar que los estafilococos puedan contaminar, al menos en pequeñas cantidades, en cualquier producto alimenticio. De hecho, han sido aislados en una gran variedad de alimentos comerciales por muchos investigadores (Jay, 2002). La

intoxicación estafilocócica supone un elevado porcentaje de los brotes, declarados o no, de gastroenteritis transmitida por alimentos (Jablonski y Boach, 1997), es considerada como la segunda de las enfermedades de transmisión alimentaria más frecuentes (Bunning *et al.*, 1997, Levine *et al.*, 1991, Bean *et al.*, 1990, Archer y Young, 1988, Cartright *et al.*, 1988, MacDonald y Griffin, 1986). En Estados Unidos se estima que sólo se informa a las autoridades sanitarias del 1 al 5% de los casos de intoxicación estafilocócica, generalmente en casos de brotes con gran difusión mediática, por lo que se considera que los datos estadísticos sobre la intoxicación están infravalorados.

Por lo que respecta a España, entre los años 2004 y 2007 se notificaron al Sistema de Información Microbiológica un total de 3.511 brotes alimentarios (no hídricos). De los brotes causados por bacterias, unos 2.000, 114 fueron causados por *Staphylococcus aureus* (CNE, 2008), lo que supone un 3,2% del total de brotes registrados. Sin embargo, este porcentaje relativamente pequeño sitúa al *S. aureus* en el tercer puesto de los microorganismos más frecuentemente notificados, detrás los brotes causados por *Salmonella* y los norovirus.

Por lo que se refiere a la presencia de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénico en los productos RTE, se puede considerar como uno de los patógenos de transmisión alimentaria más importantes en este tipo de alimentos (Jablonski y Boach, 1997; Wieneke, Roberts y Gilbert; 1993 y Genigeorgis, 1989). Este aspecto reviste un gran interés para las autoridades de salud pública de los todos los países, tanto de aquellos en vías de desarrollo como en los desarrollados (Huong *et al.*, 2010).

Concretamente, respecto a la **presencia de *S. aureus* en productos cárnicos**, alimentos objeto de este estudio que pueden ser considerados RTE, como las **salazones cárnicas** hay documentados brotes en jamones ahumados en frío, como el ocurrido en 1983 (CDC, 1983) que la USDA atribuyó a un fallo en el método de procesado o el brote sucedido en Alemania en 1992 causado por la presencia de toxina estafilocócica A en jamones curados

ahumados (Uterman y Müller, 1992). Teniendo en cuenta que, generalmente, cuando estos productos contienen toxina preformada a menudo presentan características organolépticas normales en cuanto al olor, la apariencia o la textura (Bryan, 1976).

En el caso de la **cecina** no hay, hasta ahora, brotes documentados producidos por este microorganismo en este tipo de producto. Incluso en un estudio sobre la sucesión e identificación microbiana de la familia *Micrococcaceae* en cecina (García *et al.*, 1995) *Staphylococcus aureus* no fue encontrado entre ninguna de las cepas aisladas. Sin embargo, sí hay información sobre su presencia en productos de características similares, e incluso su implicación en brotes de intoxicación alimentaria, como es el caso del charqui o el biltong. El charqui es un producto de ternera que suele tener un porcentaje de humedad, de sal y un actividad de agua que lo clasifican como un producto de humedad intermedia (Chang *et al.*, 1996, Pearson, *et al.*, 1989), grupo en el que también se incluye la cecina. En Brasil, *Staphylococcus aureus* es considerado como el segundo agente causal más común en brotes de intoxicación alimentaria y sí ha sido detectada la presencia de *S. aureus* en muestras de charqui (Franco *et al.*, 1987, Pinto *et al.*, 1998). Por lo que respecta al biltong, un tipo de carne seca originario de la cocina sudafricana con unas características similares a las del charqui y, por extensión, a las de la cecina (Burnham *et al.*, 2008, Nummer *et al.*, 2004), también ha sido documentada la presencia de *S. aureus* en el mismo (Mhlambi, 2008).

Respecto a la prevalencia de *S. aureus* en **embutidos**, en el caso del salchichón o el chorizo ha sido observado con relativa frecuencia (Lafarga *et al.*, 1986; Sanz *et al.*, 1991; Martínez *et al.*, 1982 y 1984). Por otro lado, también hay recogidos datos sobre diferentes tipos de embutidos fermentados que sí se han visto implicados en brotes de intoxicación alimentaria (Lücke, 1985).

Sin embargo, hay que matizar que, aunque está bastante demostrado que *Staphylococcus aureus* puede tolerar las condiciones intrínsecas de los embutidos resulta un pobre competidor frente a las bacterias ácido-lácticas



utilizadas como cultivos iniciadores (Metaxopoulos *et al.*, 1981<sup>a</sup>; Metaxopoulos *et al.*, 1981 b). Este hecho claramente disminuye el riesgo de intoxicación, a pesar de su frecuente presencia en la mezcla cárnica inicial utilizada para elaborar estos productos y en las plantas de procesado de los mismos (González-Fandos *et al.*, 1999).

Todo lo anteriormente expuesto podemos indicar que *Staphylococcus aureus* es un microorganismo ubicuo, cuya presencia en los alimentos es difícil de evitar pero que, afortunadamente, no suele producir un cuadro patológico grave.

El **objetivo** de los ensayos realizados en este capítulo ha sido conocer la evolución y supervivencia de *Staphylococcus aureus* al ser inoculado como contaminante en tres productos cárnicos: chorizo, jamón y cecina, cuando estos se presentan loncheados y envasados, simulando una contaminación posterior al proceso de curación al ser manipulados de forma inadecuada. Se valoró paralelamente el efecto sobre la supervivencia de este microorganismo de distintas condiciones de envasado y de diferentes temperaturas de conservación de los productos.

## **III.2. Materiales y métodos**

### **III.2.1. Planificación del Challenge Test**

Para el desarrollo de este experimento se usaron tres tipos de productos: jamón, cecina y chorizo.

Cada tipo de producto fue troceado en lonchas de 25 gramos sobre las que se inocularon 50 µl de una suspensión de *Staphylococcus aureus*. Las lonchas de producto así inoculadas se separaron en dos grupos distintos según fueron envasadas en dos tipos de atmósferas: a vacío y en atmósfera modificada con una composición de 20% CO<sub>2</sub>/80% N<sub>2</sub>, y conservadas como tres lotes a distintas temperaturas de almacenamiento: 3, 11 y 20°C.

Los muestreos microbiológicos se realizaron, para cada grupo y lote, de la siguiente manera:

- un grupo de muestras fue analizado a las dos horas de su inoculación para obtener el recuento a tiempo cero y comprobar el correcto desarrollo del procedimiento de inoculación
- para el resto de las muestras, dado que en España un periodo de conservación de 90-180 días se considera normal para este tipo de productos, se establecieron distintos lotes que fueron microbiológicamente evaluados en los siguientes días de muestreo: 1, 7, 14, 28 y 42 días, 3 y 6 meses después de la inoculación.

En cada día de muestreo se analizaban un total de 12 bolsas de cada lote de un mismo producto, dos por cada tipo de envasado y temperatura de conservación. Un resumen de la organización del trabajo realizada para este capítulo queda recogido en la tabla III.II.

**Tabla III.II. Programación del experimental de evaluación de la supervivencia de *S. aureus* inoculado en distintos productos cárnicos.**

	Producto	Envasado	Tª conservación	Días de muestreo
<b>Staphylococcus aureus</b>	<b>Chorizo</b>	Vacío	3°C, 11°C y 20°C	1,7,15,30,45,90,180
		Atmósfera 20%CO <sub>2</sub> /80%N <sub>2</sub>		
	<b>Jamón</b>	Vacío	3°C, 11°C y 20°C	1,7,15,30,45,90,180
Atmósfera 20%CO <sub>2</sub> /80%N <sub>2</sub>				
<b>Cecina</b>	Vacío	3°C, 11°C y 20°C	1,7,15,30,45,90,180	
	Atmósfera 20%CO <sub>2</sub> /80%N <sub>2</sub>			

### **III.2.2. Descripción de las muestras**

Para el desarrollo de los estudios de inoculación del presente capítulo, y de los posteriores IV y V, se utilizaron los siguientes productos cárnicos: siete barras de chorizo cular, dos jamones y tres piezas de cecina de vacuno, ya elaborados por un productor local. Esta empresa fue elegida, tras los análisis realizados a diversos productos cárnicos curados fabricados en nuestra comunidad autónoma, por presentar una calidad microbiológica más adecuada y porque, además, sus características físico-químicas se aproximaban más a la media de los valores característicos en este tipo de alimentos.

Dichos productos tras su recepción en las instalaciones del ICTAL fueron conservados a refrigeración, a menos de 4°C, hasta su posterior análisis.

### **III.2.3. Análisis físico-químico**

Previamente al desarrollo de las inoculaciones se realizaron análisis físico-químicos de los productos utilizados para este ensayo, midiendo en ellos los siguientes parámetros: actividad de agua, pH, porcentaje de cloruro sódico y cantidades residuales de nitratos y nitritos.

Dichos análisis se realizaron mediante métodos destructivos de muestreo, utilizando los mismos aparatos y protocolos detallados para los análisis físico-químicos recogidos en el apartado I.2.2. de la presente Tesis sobre las muestras tomadas de la siguiente manera:

- Una muestra aleatoria de un chorizo en representación de las 7 barras utilizadas, pues consideramos que, al tratarse de una masa del mismo lote, los aspectos de composición química y contaminación microbiológica serán semejantes.
- En el caso del jamón y la cecina se analizaron todas las piezas, pues aunque pertenecen al mismo lote de fabricación consideramos que la procedencia de las mismas podría ser un factor influyente en los resultados.

### **III.2.4. Análisis microbiológico general**

En los productos sobre los que se llevaron a cabo las inoculaciones se realizó previamente una evaluación de su calidad microbiológica mediante un análisis microbiológico análogo al descrito en los apartados I.2.2. y II.2.3. de esta Tesis para los siguientes grupos microbianos: microbiota aerobia mesófila viable, microbiota psicrotrofa, enterobacterias, coliformes, *E. coli*, esporulados aerobios y anaerobios, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Clostridium botulinum*.

### **III.2.5. Cepa y preparación del inóculo**

La cepa de *Staphylococcus aureus* utilizada en este estudio como inóculo pertenece a la colección propia del Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de León, cepa productora de toxina B.

La cepa se mantenía conservada a -30°C en crioviales con una mezcla de 0,5 ml de glicerol (Panreac) y 0,5 ml de caldo de cultivo TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid).

Para la preparación del inóculo, 0,1 ml de la cepa se transfirieron a 5 ml de Caldo de Triptona y Soja (TSB, Oxoid) en tubo, incubándose a 37°C durante 24 horas. De este tubo de recuperación se hizo otro pase de 0,1 ml a 5 ml de TSB en iguales condiciones de tiempo y temperatura. Posteriormente, de este último pase se hicieron diluciones decimales en Agua de Peptona Bacteriológica al 0,1% (BP, Oxoid) de las cuales 0,1 ml fueron sembrados en Baird Parker (Oxoid) e incubadas a 37°C durante 24 horas, permitiendo conocer así la concentración del microorganismo en el tubo de partida. Por otro lado, del mismo último pase se transfirieron 0,1 ml a 5 ml de TSB incubado a 37°C durante 24 horas, tras las cuales de este tubo se hicieron las diluciones correspondientes en BP para obtener el inóculo. En todos los pases se

realizaron siembras en estría sobre medio Baird Parker (Oxoid) para comprobar la pureza del cultivo.

### **III.2.6. Preparación, inoculación y condiciones de almacenamiento de las muestras**

Posteriormente a los análisis físico-químicos y microbiológicos de las muestras, de cada producto cárnico, chorizo, cecina y jamón utilizados en las posteriores inoculaciones, se obtuvieron, en condiciones de esterilidad, muestras consistentes en lonchas de 25 gramos. En cada loncha se practicó un corte intermedio que permitiese introducir el inóculo para conseguir, mediante este procedimiento, reproducir lo más fielmente posible las condiciones naturales de una posible contaminación, ya que así el inóculo del microorganismo quedaría retenido en los pliegues de la loncha (en las bolsas conservadas con atmósfera modificada la inyección del gas suponía una separación de las mismas por la poca cantidad de producto depositada en cada una).

Los inóculos se realizaron mediante el depósito de 50  $\mu$ l, de la dilución  $10^5$  recuperada de la cepa de *Staphylococcus aureus*, en cada loncha con la intención de modificar lo menos posible las características físico-químicas del producto (Pal, 2008). Se obtienen concentraciones finales del inóculo por gramo de producto entre  $10^3$  y  $10^4$  ufc/g (Hogg *et al.*, 2003).

Las lonchas así inoculadas fueron introducidas inmediata, individual y asépticamente en bolsas estériles (tamaño 120 x 250 mm) de poliamida / polietileno 20/100 (Industrias Pargon C.B. Salamanca. España) con un espesor total de 120 micras, esencia 115,80 g/m<sup>2</sup> y producción 8,64 m<sup>2</sup>/kg, una permeabilidad al oxígeno de 50 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23°C, al dióxido de carbono de 150 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23°C y al nitrógeno de 10 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23 °C y una permeabilidad al vapor de agua de 1,9 g/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23 °C con 85 % de r.F.

La mitad de las muestras así procesadas fueron envasadas a vacío (Technotrip, modelo EV-7.TD) y la otra mitad en atmósfera modificada, cuya composición (v/v) era 20% de dióxido de carbono, 80 % de nitrógeno (S.E. de Carburos Metálicos, S.A. España). Esta composición gaseosa es la usada habitualmente en la industria alimentaria cárnica.

Las muestras inoculadas y envasadas fueron conservadas a distintas temperaturas: 3, 11 y 20°C.

Todas las muestras tienen un duplicado para cada uno de los puntos de muestreo: producto, sistema de envasado y temperatura de conservación.

### **III.2.7. Análisis microbiológico de las muestras inoculadas**

Antes de empezar los análisis microbiológicos las bolsas se higienizaron por fuera con una toalla de papel humedecida en etanol al 70 % (v/v).

Posteriormente, siguiendo las especificaciones de la APHA 2001 para el análisis microbiológico, se practicó un corte aséptico en la parte superior de la bolsa a la que se añadieron 225 ml de agua de peptona tamponada (Oxoid) y se homogeneizó la misma durante dos minutos en homogenizador (Masticato, IUL). Este procedimiento nos permitió trabajar con toda la muestra en la misma bolsa donde ha sido conservada, siendo recuperada así la totalidad del inóculo. De la misma bolsa también se hicieron diluciones decimales subsiguientes en tubos de 9 ml de Agua de Peptona Bacteriológica al 1% (BP, Oxoid).

Para los recuentos de *Staphylococcus aureus* de la bolsa con homogeneizado y de sus diluciones se sembraron, por duplicado, 0,1 ml en superficie sobre placas con medio Baird Parker (Oxoid), que fueron incubadas a 37 °C durante 48 horas. Como colonias de la cepa inoculada de *Staphylococcus aureus* se identificaron las que presentaron la morfología característica por este medio: colonias negras o gris oscuras por reducción del telurito, con un diámetro superior a 2 mm, brillantes, lisas, convexas y rodeadas por zonas de aclaración de 2 a 5 mm por la acción lecitinasa (Figura III.I).

**Figura III.I. Morfología de colonias de *Staphylococcus aureus* en placa de medio Baird Parker.**



Las colonias de la cepa inoculada de *Staphylococcus aureus* presentan una morfología de tamaño pequeño, color negro, superficie lisa y brillante y halo translúcido de precipitado alrededor.

### III.3. Resultados

#### III.3.1. Resultados de los análisis microbiológicos y físico-químicos previos de los productos a inocular

Los resultados de los **análisis físico-químicos** se recogen en la siguiente tabla III.III.

**Tabla III.III. Resultados de los análisis físico-químicos de los productos a inocular.**

Producto	pH	Aw	NaCl (%)	Nitratos (ppm)	Nitritos (ppm)
Chorizo	4,99	0,874	2,34	0,84	<0,50
Jamón 1	5,60	0,883	3,44	2,45	<0,50
Jamón 2	5,88	0,892	4,02	3,34	<0,50
Cecina 1	5,76	0,903	3,88	3,81	<0,50
Cecina 2	5,69	0,863	4,39	3,27	<0,50
Cecina 3	5,75	0,900	3,90	3,50	<0,50

Los resultados de los **análisis microbiológicos** realizados a la totalidad de las muestras a inocular presentaban la ausencia de: enterobacterias, coliformes, *Escherichia coli*, esporulados aerobios y anaerobios, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Clostridium botulinum*. Los datos obtenidos para la microbiota aerobia mesófila viable y para la microbiota psicrotrofa se recogen en la tabla III.IV.

**Tabla III.IV. Resultados de los análisis microbiológicos de las muestras a inocular.**

Producto	MAMV	MP
Chorizo	8,55	6,15
Jamón 1	6,72	6,77
Jamón 2	7,69	4,53
Cecina 1	6,38	5,97
Cecina 2	7,25	7,27
Cecina 3	6,55	6,02

MAMV: Microbiota Aerobia Mesófila Viable; MP: Microbiota Psicrotrofa

### III.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero

A las dos horas de la inoculación y tras su envasado a vacío y su conservación a refrigeración a 3°C o a temperatura ambiente a 20°C, se realizó un análisis microbiológico con objeto de valorar la evolución del inóculo y una detección precoz de posibles fallos. Se excluyeron de este análisis inicial las muestras envasadas en atmósfera modificada por el escaso efecto del gas en tan poco tiempo. Los resultados obtenidos se agrupan en la tabla III.V.



**Tabla III.V. Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero de los productos inoculados con *Staphylococcus aureus*.**

Tª conservación muestra		20°C	20°C	3°C	3°C
<b>Producto</b>	<b>CHORIZO vacío</b>	4,15	4,06	3,88	4,06
	<b>JAMÓN vacío</b>	3,17	3	3	2,69
	<b>CECINA vacío</b>	2,39	2,30	2,39	2,30

### **III.3.3. Resultados de los análisis microbiológicos del producto inoculado en los distintos tiempos de muestreo**

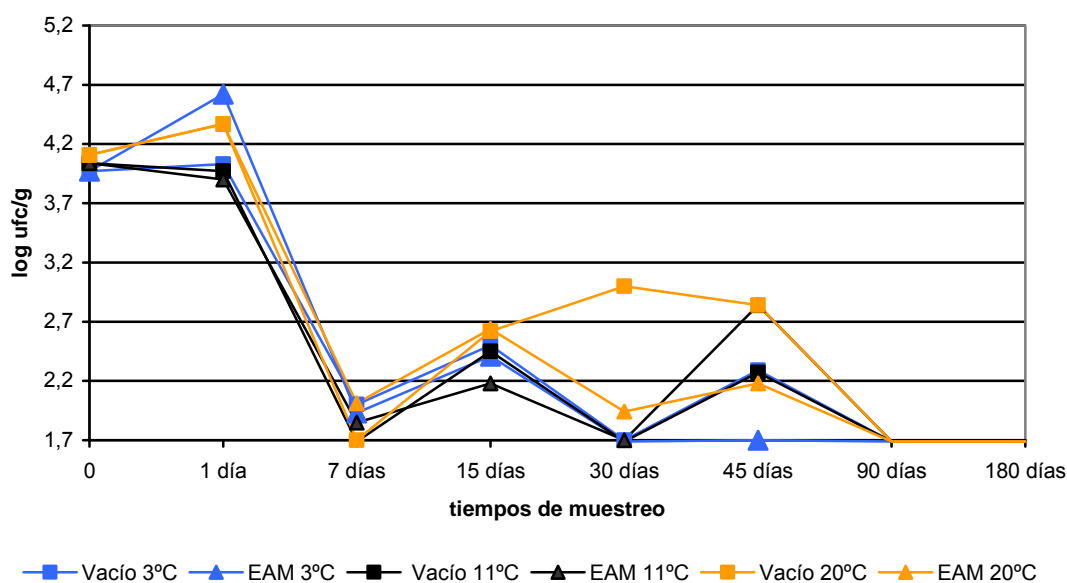
Los resultados de los análisis microbiológicos realizados en cada punto de muestreo, evaluados a 1, 7, 15, 30, 45, 90 y 180 días, quedan reflejados en las tablas y gráficos recogidos a continuación.

**Tabla III.VI. Resultados de la evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en chorizo.**

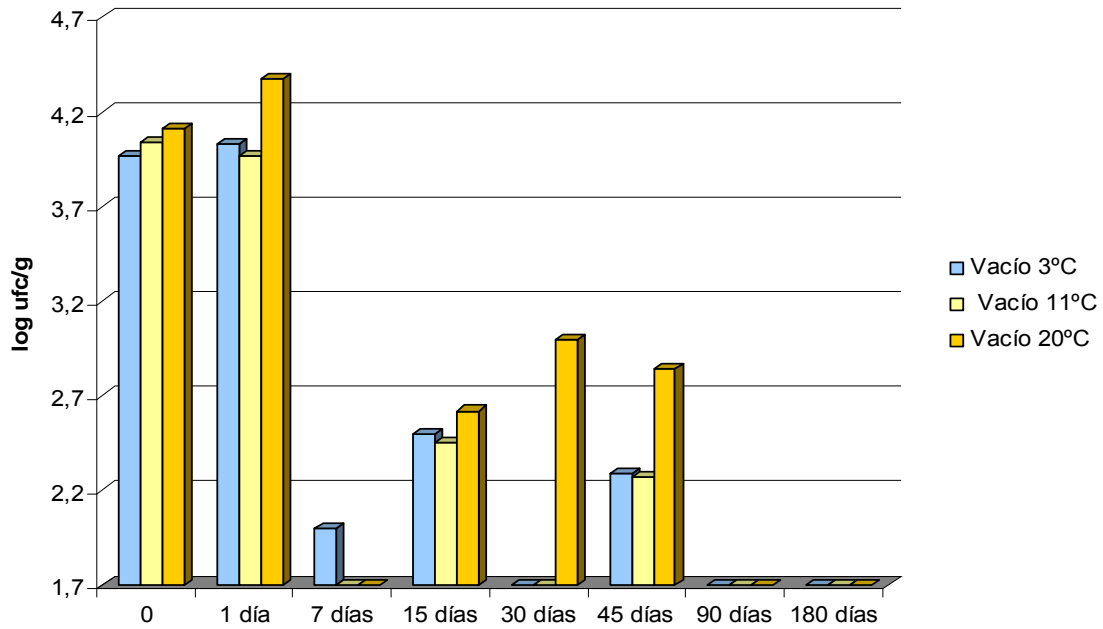
Chorizo		<i>Staphylococcus aureus</i>						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	4,11	2,00	2,60	1,70	2,88	-	-
		3,94	2,00	2,40	-	-	-	-
	EAM	4,90	1,69	2,17	-	1,70	-	-
		4,33	2,17	2,65	-	-	-	-
11°C	Vacío	4,06	-	2,60	-	2,54	-	-
		3,88	-	2,30	-	2,00	-	-
	EAM	3,94	2,00	2,65	1,70	2,60	-	-
		3,86	-	-	-	3,08	-	-
20°C	Vacío	4,52	-	2,84	3,30	3,27	-	-
		4,21	1,70	2,39	2,70	2,40	-	-
	EAM	4,38	2,17	2,47	2,18	2,18	-	-
		4,35	2,00	2,81	-	2,18	-	-

EAM: Envasado en Atmósfera modificada. El dato numérico de cada punto de muestreo representa el logaritmo decimal del número de ufc/gramo de producto. - : Por debajo del límite de detección de la técnica.

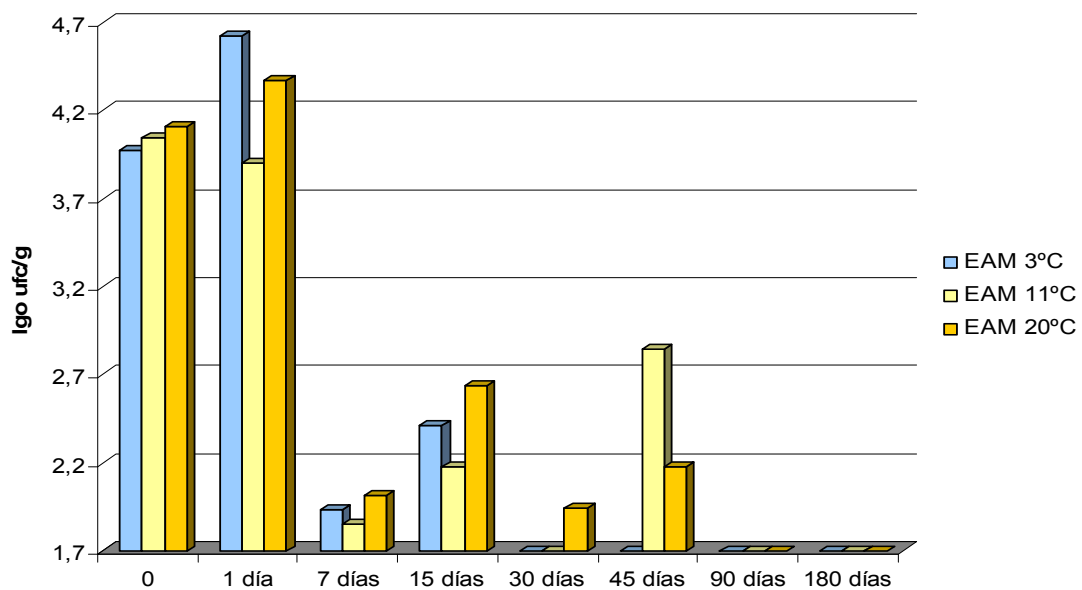
**Figura III.II. Evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en chorizo**



**Figura III.III. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en el chorizo envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.**



**Figura III.IV. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en el chorizo envasado en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.**

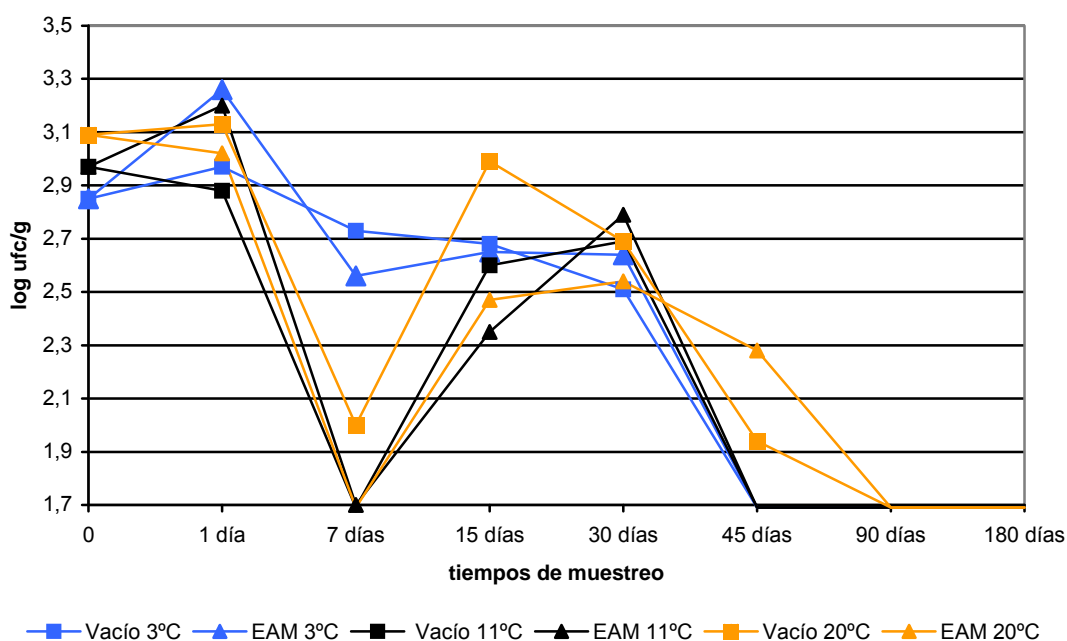


**Tabla III.VII. Resultados de la evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en jamón.**

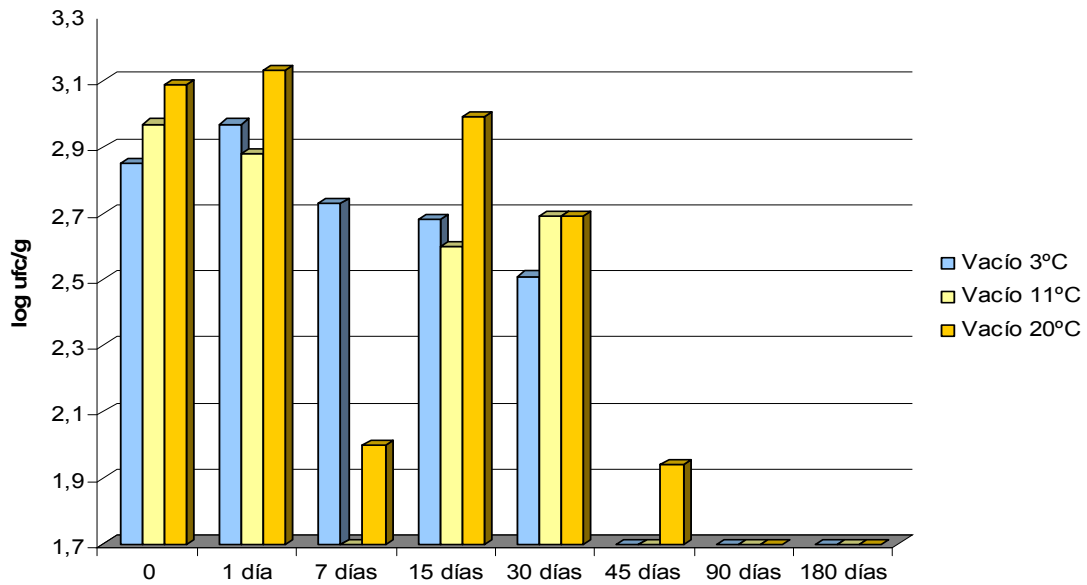
Jamón		<i>Staphylococcus aureus</i>						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	3,19	2,47	2,81	2,48	-	-	-
		2,74	2,98	2,54	2,54	-	-	-
	EAM	3,11	2,65	2,60	2,74	-	-	-
		3,40	2,47	2,69	2,54	-	-	-
11°C	Vacío	3,11	-	2,60	2,48	-	-	-
		2,65	-	2,60	2,90	-	-	-
	EAM	3,16	1,70	2,30	2,65	-	-	-
		3,23	-	2,39	2,93	-	-	-
20°C	Vacío	3,24	2,30	2,98	2,78	1,70	-	-
		3,02	-	3,00	2,60	2,18	-	-
	EAM	3,09	-	2,54	2,54	1,70	-	-
		2,95	-	2,39	2,54	2,85	-	-

EAM: Envasado en Atmósfera modificada. El dato numérico de cada punto de muestreo representa el logaritmo decimal del número de ufc/gramo de producto. - : Por debajo del límite de detección de la técnica.

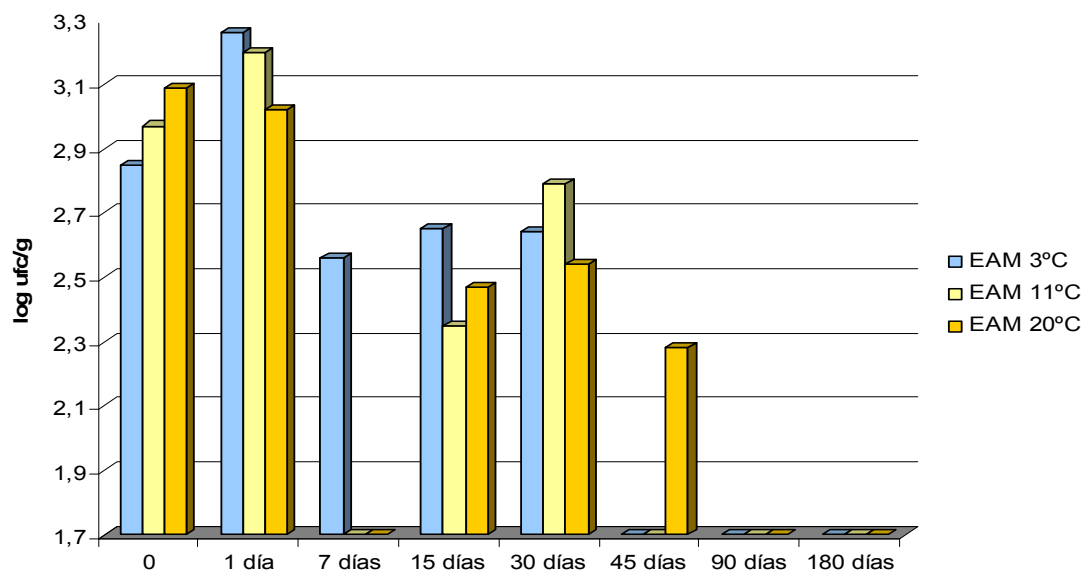
**Figura III.V. Evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en jamón**



**Figura III.VI. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en el jamón envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.**



**Figura III.VII. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en el jamón envasado en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.**

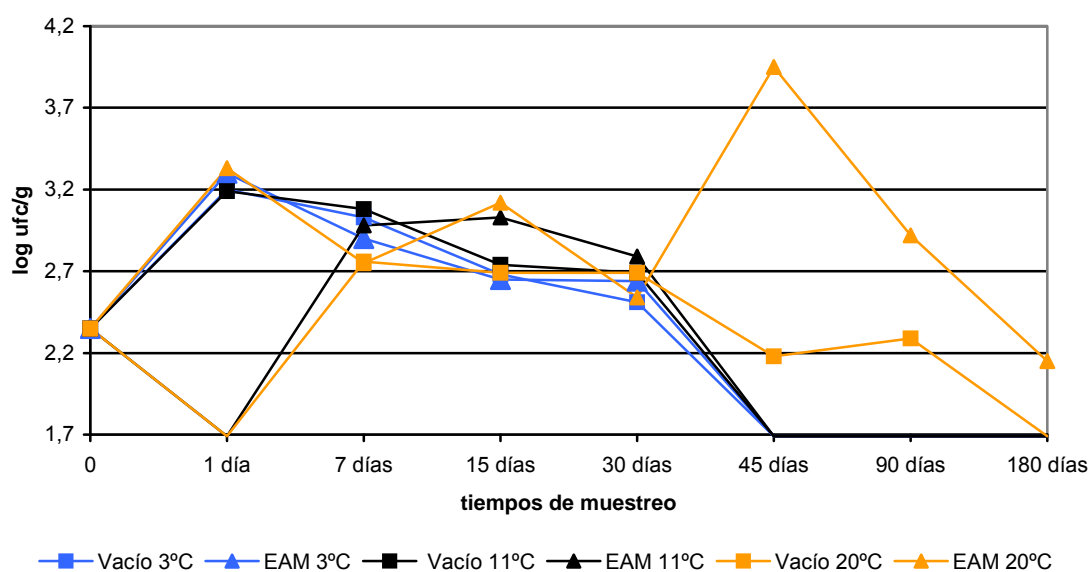


**Tabla III.VIII. Resultados de la evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en cecina.**

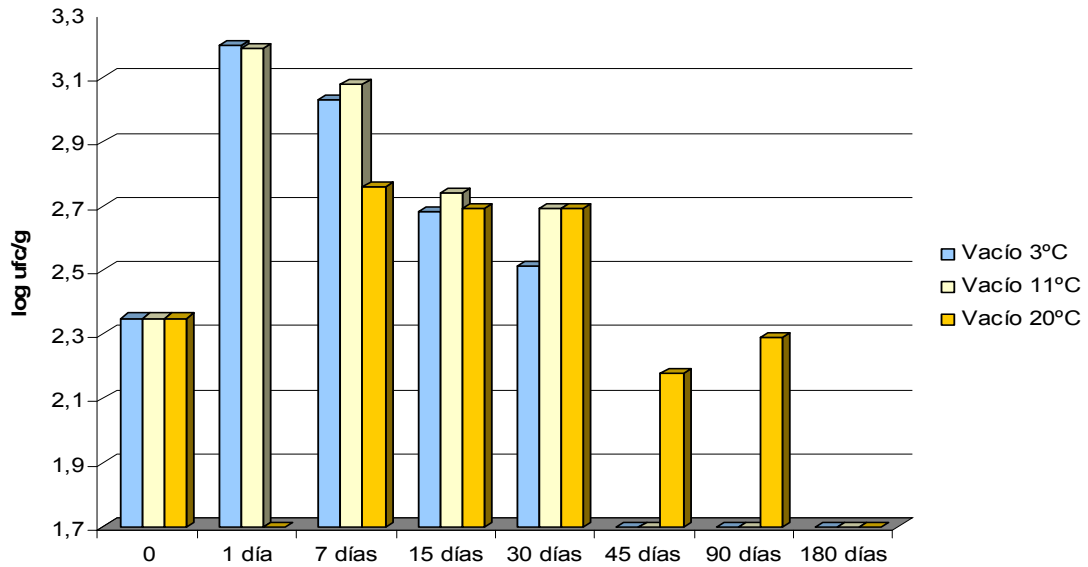
Cecina		<i>Staphylococcus aureus</i>						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	3,00	3,06	2,81	2,48	-	-	-
		3,39	3,00	2,54	2,54	-	-	-
	EAM	3,30	2,90	2,60	2,74	-	-	-
		3,30	2,90	2,69	2,54	-	-	-
11°C	Vacío	3,39	3,02	2,93	2,48	-	-	-
		3,00	3,13	2,54	2,90	-	-	-
	EAM	1,70	3,22	3,06	2,65	-	-	-
		1,70	2,74	3,00	2,93	-	-	-
20°C	Vacío	1,70	2,98	3,08	2,78	2,18	2,18	-
		1,70	2,54	2,30	2,60	2,18	2,40	-
	EAM	3,47	2,60	3,09	2,54	4,01	2,18	2
		3,18	2,90	3,15	2,54	3,89	3,65	2,30

EAM: Envasado en Atmósfera modificada. El dato numérico de cada punto de muestreo representa el logaritmo decimal del número de ufc/gramo de producto. - : Por debajo del límite de detección de la técnica.

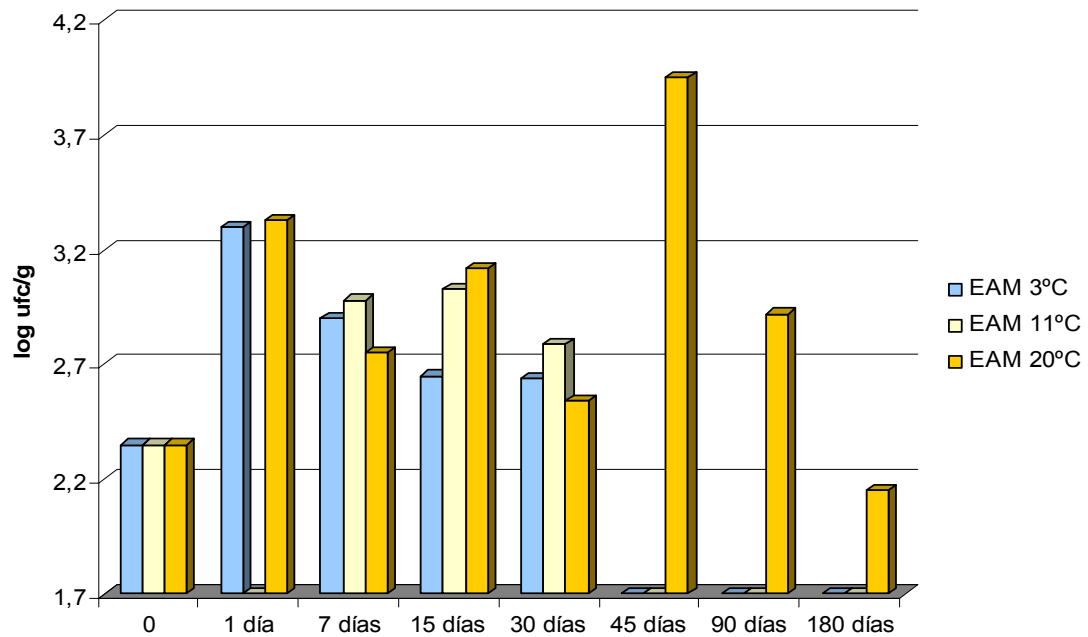
**Figura III.VIII. Evolución de *Staphylococcus aureus* inoculado en cecina**



**Figura III.IX. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.**



**Figura III.X. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Staphylococcus aureus* en la cecina envasada en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.**



### III.4. Discusión

Por lo que respecta al comportamiento y supervivencia de *Staphylococcus aureus* en el **chorizo** envasado, en nuestros resultados se observa una rápida disminución de la carga inicial inoculada del patógeno. Como puede ser observado en la figura III.II, en el punto de muestreo correspondiente a siete días tras la inoculación y el envasado se produce una disminución de varias unidades logarítmicas en los recuentos para todas las temperaturas y sistemas de envasado. Esto indica que el chorizo inoculado, con sus especiales características físico-químicas y microbiológicas, no sólo inhibe su crecimiento sino que afecta claramente a la supervivencia de este patógeno. Por otro lado, se producen ligeros aumentos en los recuentos obtenidos a los 15 días del envasado, e incluso a los 45 días, pero nunca en proporciones comparables a la disminución inicial observada.

En los muestreos realizados a partir de los 90 días la presencia de *Staphylococcus aureus*, por el método descrito en el apartado III.2.7., no ha sido detectada en ninguna de las muestras, independientemente de la atmósfera de envasado y de la temperatura de conservación.

Otro aspecto que se puede observar en figura III.II. es el control que parecen ejercer las óptimas temperaturas de conservación, 3°C, sobre el microorganismo. Como puede comprobarse a partir del día 30 las muestras conservadas a 3°C presentan unos recuentos bastante inferiores, e incluso no se obtienen recuentos a partir éste día para muchas de las muestras (tabla III.VI.).

Por otro lado, en el chorizo no se observan diferencias significativas en el comportamiento de este patógeno entre las muestras envasadas a vacío y las muestras envasadas en atmósferas modificadas.

Respecto a las características físico-químicas que controlan el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, las muestras de chorizo inoculadas se



encuentran dentro del rango de pH, entre 4,6 y 10, y actividad de agua, 0,83 y 0,99, a los que puede crecer este microorganismo según ha sido documentado por algunos autores (Charlier *et al.*, 2009). Respecto a las concentraciones de sal, *S. aureus* puede crecer bien a concentraciones entre el 7 y el 10% (Jay, 2002), muy por encima de la media observada para el chorizo inoculado, que era de 2,34%. Por lo tanto, no podemos considerar a estos factores como los responsables de la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en las muestras de chorizo inoculadas.

Por lo tanto, puede ser, y así parece que lo demuestran diversos estudios científicos recogidos por Charlier *et al.*, 2009, que las bacterias ácido-lácticas (BAL), microbiota dominante en los embutidos fermentados, sean las causantes de la inhibición del crecimiento de *S. aureus*. La causa de esta inhibición, según el artículo citado, parece basarse en la acción conjunta de los siguientes factores: la acidificación y la producción de ácidos orgánicos, la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y de bacteriocinas y la competición por los nutrientes, dado que *S. aureus* resulta un pobre competidor frente a las BAL (Muntal, 2007). Por otro lado, la contaminación inicial al comienzo de la fermentación, también parece influir la capacidad de inhibición de las BAL sobre *S. aureus*, pues si la población inicial de este patógeno es tan elevada o mayor que la de las BAL, el efecto inhibitorio disminuye, multiplicándose, en función del número inicial, hasta niveles superiores a los considerados como necesarios para producir la cantidad suficiente de toxina. Por último, la capacidad de las BAL para inhibir a este patógeno presenta variabilidad inter e intra-específica, aspecto corroborado por estudios como el realizado por Sameshima *et al.*, 1998.

Por lo que respecta al efecto de la temperatura de conservación sobre la inhibición de este patógeno, a partir del día 15 de muestreo sí que puede ser observado un aumento de los recuentos obtenidos en las muestras conservadas a 20°C, donde se rompe, claramente, la cadena de frío. Esto resultados pueden ser comparados con los observados en el trabajo realizado por Ingham *et al.*, 2005, donde también estudia el comportamiento de *S. aureus* inoculado sobre varios tipos de productos cárnicos envasados a vacío y

conservados durante cuatro semanas a 21°C. En este estudio se observa a 28 días una notable reducción de la carga inicial inoculada, semejante a la nuestra. Estas disminuciones son del orden de 3-4 log ufc, desde el momento inicial al final del estudio. Pero, por otro lado, a 21°C no se produce en ninguna de las muestras de salami inoculadas una desaparición del microorganismo tras 28 días. Los valores de  $a_w$  y pH obtenidos en este estudio son muy similares a los observados en el nuestro, entre 4,8 y 5,1 de pH y 0,76-0,92 de  $a_w$ , por lo que se puede establecer una buena comparación entre los resultados indicados en ambos.

El comportamiento del **jamón** inoculado con *S. aureus* es similar al observado en el chorizo, con un notable descenso de varias unidades logarítmicas en los recuentos del patógeno a partir del día uno de muestreo (figura III.V.) Esto parece indicar también que las características físico-químicas, y puede ser que microbiológicas, del jamón afectan al crecimiento de *S. aureus*. Sin embargo, en este caso la recuperación de este microorganismos observada a los 15 días de envasado es mayor que el mostrado para el chorizo.

En este producto, a partir del día 30 de muestreo el patógeno desaparece de la mayoría de las muestras, aunque sigue estando presente en las conservadas a 20°C el día 45 de muestreo, desapareciendo a partir de este punto en todas las muestras analizadas. En este aspecto parece que las temperaturas de refrigeración tienen un efecto más efectivo y precoz sobre el control del microorganismo.

También en este caso no se observan diferencias significativas en el comportamiento del patógeno entre los diferentes sistemas de envasado evaluados (figuras III.VI. y III.VII.). Aunque la producción de toxina no es un aspecto considerado durante el experimental de este trabajo de investigación, nos parece interesante citar una publicación relativa al efecto del envasado a vacío sobre el desarrollo de *Staphylococcus aureus*, en la cual, tras la inoculación de lonchas de jamón bologna y su envasado en atmósfera normal o

a vacío, se observa que, conservadas las muestras a temperatura de crecimiento del patógeno, el vacío puede reducir la probabilidad de producción de toxina (Christiansen y Foster, 1965). En relación a los recuentos del patógeno, aspecto si considerado por nosotros, la afirmación de Christiansen y Foster se basa en que en su experimento los resultados indican que en las muestras envasadas a vacío el incremento logarítmico del inóculo era bastante menor que en las bolsas envasadas en atmósfera normal, prácticamente la mitad.

Por lo que se refiere a las características físico-químicas del jamón inoculado, entre 5,60-5,88 de pH, 0,883-0,892 de actividad de agua y 2,34-4,02 de porcentaje de sal, éstas se encuentran dentro de los rangos anteriormente citados (Charlier *et al.*, 2009; Jay, 2002) en los cuales *S. aureus* puede crecer, por lo tanto no podemos considerar a estos factores como los limitantes o inhibidores del crecimiento del mismo.

En un estudio también realizado sobre el comportamiento de *S. aureus* en el jamón, donde piezas frescas fueron inoculadas con el patógeno para comprobar su comportamiento durante el procesado (Portocarrero *et al.*, 2002). En el mismo se demuestra que con una actividad de agua entre 0,94 y 0,91 y una concentración de sal entre 4,45 y 3,37%, la población inicial inoculada, entre  $10^8$  y  $10^{10}$  ufc/g, “a pesar de que es bien sabido que *S. aureus* resiste bien la el proceso de desecación y altos porcentajes de sal”, va disminuyendo. Es controlada por las condiciones de este producto hasta no ser detectada la presencia del patógeno tras 178 días de la elaboración. De todas maneras, con esta elevada carga inicial, a pesar de que las condiciones para la producción de toxina suelen ser más restrictivas, la presencia de toxina elaborada por *S. aureus* es detectada en muchas de las muestras analizadas.

Otro interesante estudio publicado de Untermann y Müller, 1992, tiene en cuenta la multiplicación y la producción de toxina por *S. aureus* inoculado en jamones en distintos puntos del proceso de elaboración y venta, conservados a distintas temperaturas de almacenamiento). Los resultados recogidos indican

que, a temperatura de conservación de 20°C de jamones con una actividad de agua de 0,918 (A) y 0,890 (B), el patógeno inoculado desaparece en la muestra B, no así en la A donde se mantiene la concentración inicial del inóculo, 5 log ufc/g, a 168 horas. En este estudio también se afirma que la proliferación y producción de enterotoxina estafilocócica también puede ocurrir en los jamones curados en el punto de venta, especialmente si son loncheados.

Por último, en la **cecina** inoculada, el comportamiento observado es ligeramente diferente a lo descrito para el chorizo y el jamón. En este producto, partimos de un inóculo inicial menor, 2,5 log ufc/g, que el de los otros productos inoculados. Tras un aumento inicial en el primer día de la inoculación hasta valores de más de 3 log ufc/g, el descenso observado en el día siete es mucho menor, manteniéndose constantes los recuentos hasta el día 30, a partir del cual se observan nítidas diferencia de comportamiento entre las muestras conservadas a refrigeración y las conservadas a temperatura ambiente. En este aspecto es notable la supervivencia del microorganismo hasta el final del challenge test en las muestras envasadas en atmósferas modificadas y conservadas a temperatura ambiente, con un importante aumento de los recuentos a los 45 días del envasado en las muestras conservadas a temperatura ambiente, aunque luego vayan disminuyendo.

Un aspecto también distinto a lo observado para el chorizo y el jamón, es que hasta el día 45 de muestreo, donde el patógeno no es aislado en todas las muestras a excepción de las conservadas a temperatura ambiente, en todas las muestras se obtienen recuentos en cantidades prácticamente constantes.

Todo ello parece demostrar que las características físico-químicas, entre 5,69 y 5,76 de pH, 0,903-0,863 de  $a_w$  y 3,88-4,39 de porcentaje de sal, y microbiológicas de este producto parecen ejercer un control menor sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* que en los otros productos evaluados. Los valores físico-químicos antes señalados, al igual que para el chorizo y el jamón, se encuentran dentro del amplio rango en el cual este patógeno puede crecer. Por otro lado, salvo una actividad de agua ligeramente superior, el resto

de las características físico-químicas son parecidas a las obtenidas para el jamón, producto con el que comparte similitudes de elaboración. Sin embargo, la evolución del inóculo es ligeramente distinta. Especialmente respecto al jamón, no se observa ese acusado control inicial y, aunque a 30 días de muestreo casi todas las muestras presentan el mismo nivel de contaminación, 2,5 log ufc/g aproximadamente, es en los últimos puntos de muestreo donde la capacidad de controlar el crecimiento es notablemente menor, especialmente a 11°C y 20°C.

Específicamente sobre la cecina, no se ha encontrado ningún estudio publicado similar al realizado por nosotros. Sin embargo, en el caso del charqui, Ingham *et al.*, 2005, evalúan el comportamiento de *S. aureus* inoculado en este producto, envasado a vacío y conservado a 21°C. Los resultados obtenidos indican que tras unos recuentos iniciales entre 5,7-6,4 log ufc/g, que a los 28 días se produce una notable disminución de los mismos, hasta 1,4-2,8 log ufc/g, resultado muy similar a lo observado para el salami en este mismo estudio. En nuestro ensayo, para ese mismo periodo de tiempo desde el inóculo inicial, aproximadamente 2,5 log ufc/g, tras el día 30 de muestreo en prácticamente todas las muestras se encuentran en ese mismo nivel de contaminación. En este estudio los valores de actividad de agua son bastante menores, 0,68-0,82, a los obtenidos por nosotros sobre la cecina, ya que se trata de productos similares pero no iguales.

Lara *et al.*, 2003, en su ensayo sobre la evaluación de la supervivencia de *S. aureus* en el charqui, observan que, aunque este patógeno sobrevive durante la mayor parte del proceso de elaboración, las condiciones finales del mismo, especialmente la baja actividad de agua, entre 0,70-0,750, crean unas condiciones que inhiben su crecimiento, condiciones no extrapolables a nuestro producto. Este autor concluye que la actividad de agua de este producto es un factor claramente limitante en la inhibición de este microorganismo.

Sobre el biltong hay publicado un estudio de Naidoo y Lindsay, 2010, parecido al anterior en el que se observan unas reducciones decimales entre 4

y 6 log ufc/g para dos métodos de elaboración evaluados, tradicional y moderno, sobre el inóculo inicial de *S. aureus*. También se indica que en ninguno de los dos métodos se consigue la completa desaparición, tras 96 horas de evaluación, del patógeno por debajo del límite de detección. El autor concluye que en este tipo de producto, que puede considerarse similar a la cecina, su proceso de elaboración no controla totalmente el crecimiento de *S. aureus*.

A modo de conclusión general, por comparación del comportamiento del patógeno en los tres productos evaluados, podemos afirmar que el chorizo y el jamón presentan un comportamiento mejor en cuanto al control de *Staphylococcus aureus* inoculado que la cecina. Por otro lado, las temperaturas elevadas de conservación, 20°C, dificultan el control del microorganismo por parte de estos productos, especialmente en el caso de la cecina. De lo que insistimos en la importancia de la conservación de los productos envasados a temperatura correcta de refrigeración. Y, por último, en conjunto no se observan diferencias significativas de la influencia de las dos atmósferas de conservación evaluadas sobre el control de dicho patógeno, sólo tras 180 días a 20°C en la cecina los recuentos obtenidos para las atmósferas modificadas reflejan una clara diferencia respecto al resto de los resultados.



## **CAPÍTULO IV**

**Evaluación de la supervivencia de  
*Listeria monocytogenes*  
inoculada en productos cárnicos  
loncheados y envasados en diferentes atmósferas**





## IV.1 Introducción

**LA LISTERIOSIS** de origen alimentario es una enfermedad relativamente poco frecuente pero con tasas de mortalidad elevadas, de aproximadamente el 20% (EFSA, 2010), si se compara con otras que también son transmitidas por alimentos (FAO/OMS, 2004). De hecho se considera la enfermedad emergente de transmisión alimentaria más importante de los últimos 25 años, cuyo repentino modo de aparición en la epidemiología mundial no ha tenido precedentes (Jay, 2000, Doyle y Beuchat, 2007). Sin embargo, el microorganismo causal, *Listeria monocytogenes*, ya había sido descrito hace más de 70 años por Murray *et al.*, 1926, quienes la aislaron e identificaron como agente causal de una enfermedad septicémica que afectaba a conejos y cobayas en su laboratorio en Cambridge, denominándola *Bacterium monocytogenes*. Posteriormente, Pirie la renombró como *Listeria monocytogenes* (Rocourt, 1999)

Este brusco aumento epidemiológico de casos de listeriosis se considera el resultado de muy diversos factores, como son:

- el incremento de la esperanza de vida en los países desarrollados
- la epidemia mundial de SIDA
- los cambios en la producción y elaboración de alimentos
- los cambios en los hábitos de consumo de alimentos, con su marcado aumento del consumo de alimentos RTE o Listos Para su Consumo.

El agente causal de la listeriosis es un tipo de bacteria perteneciente al género **Listeria**, formado por bacilos gram-positivos cortos, de 0,4 por 1-1,5  $\mu\text{m}$ , regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas, y móviles a temperaturas de entre 10° y 25 °C por la presencia de flagelos peritricos. Son microaerófilos y anerobios facultativos y su temperatura óptima de crecimiento está entre 30°C y 37°C, aunque como psicrotrofos pueden crecer a 4°C en pocos días. Las *Listeria spp.* son catalasa positivas y oxidasa negativas.

Por lo que respecta a su clasificación taxonómica, el género *Listeria* en un principio fue incluido, basándose en sus caracteres morfológicos, en la familia *Corynebacteriaceae*, séptima edición del Manual de Bergey (1957), pero en la actualidad se sabe que tiene un parentesco más cercano con otros microorganismos, considerándose que pertenece, junto con *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochothrix*, a una subrama del subfilo *Clostridium*. Esta actual clasificación tiene su base en que el porcentaje GC de todos sus miembros es inferior a 50 (Jones, 1988), estando comprendido entre el 36 y el 42% (Rocourt, 1994).

Relativo a la taxonomía intragenérica de *Listeria*, en el momento actual se ha asumido que está constituido por 6 especies diferentes: *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, con dos subespecies: *L. ivanovii* subsp. *ivanovii* y *L. ivanovii* subsp. *londonensis*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. gravi* y *L. seeligeri*. (Boerlin y cols., 1992; Rocourt y cols., 1992; Rocourt y Cossart, 1997; Rocourt, 1999), siendo la *Listeria monocytogenes* la principal causante de infecciones en los humanos (ICMSF, 1996). Aunque de esta especie en base a antígenos somáticos y flagelares se han descrito cuatro serogrupos (1/2, 3, 4 y 7) y 17 serovares, entre el 50 y el 70% de los brotes y casos esporádicos se deben al serovar 4b (Capita, 2008). Asociados también con relativa frecuencia a los procesos de enfermedad humana se encuentran los serovares 1/2a y 1/2b. Los tres serovares mencionados provocan en su conjunto más del 90% de las listeriosis humanas y animales (Roser y Marth, 2007).

La listeriosis es una atípica enfermedad de transmisión alimentaria, poco frecuente pero objeto de gran atención en Salud Pública debido a la gravedad de sus síntomas y a su elevada tasa de mortalidad (EFSA, 2007a). Según estimaciones, referidas a Estados Unidos, *L. monocytogenes* sería la responsable del 28% de las muertes asociadas a contaminantes de origen biológico en alimentos (Mead *et al.*, 1999).

Se conocen dos cuadros de listeriosis: invasiva y no invasiva, siendo la primera la más frecuente, también conocida como gastroenteritis febril por listerias, que cursa con vómitos y diarrea y suele ser autolimitante. La listeriosis invasiva produce un grave cuadro clínico con síntomas como meningitis, septicemia y aborto con una elevada tasa de mortalidad, entre un 20 y un 30% de los casos (Swaninathan *et al.*, 2007), que puede dejar importantes lesiones y secuelas. Otros síntomas menos frecuentes son varios tipos de infecciones focalizadas como osteomielitis, infecciones pleurales y peritonitis (Slutsker, 1999). Suele presentar un largo periodo de incubación, siendo especialmente susceptibles las personas inmunodeprimidas, en especial enfermos de sida, personas con tratamientos inmunosupresores, ancianos y mujeres gestantes, aunque también puede presentarse en individuos sanos. En un estudio relativo a los casos de listeriosis invasiva (con exclusión de los materno-fetales) llevado a cabo en Dinamarca se puso de manifiesto que la mortalidad en la listeriosis se asocia a pacientes con alguna de las circunstancias de susceptibilidad antes señaladas (Gerner-Smidt *et al.*, 2005).

*L. monocytogenes* produce una toxina citolítica y hemolítica, llamada listeriolisina O, que actúa como un importante factor de virulencia. Se trata de una proteína de 52 kD que se secreta a pH bajo y baja concentración de hierro, condiciones presentes en el interior del fagolisosoma. Cuando es fagocitado, el microorganismo empieza a fabricar la listeriolisina, que se fija al colesterol y rompe la membrana del fagolisosoma. Este puede ser el principal factor que favorece su supervivencia intracelular, una de las características patogénicas más definitorias de *L. monocytogenes*. (ICMSF, 2003).

Por lo que respecta a la dosis infectiva, no se dispone de datos epidemiológicos concluyentes que permitan establecer el nivel de contaminación de los alimentos implicados en los casos o brotes de listeriosis alimentaria y, además, ésta depende de muchos factores, como el estado inmunológico del individuo infectado y la virulencia de la cepa. Estudios sobre la capacidad infectiva de este microorganismo en voluntarios humanos son imposibles, por lo que investigaciones llevadas a cabo sobre monos y ratones sugieren que la exposición a bajas dosis del microorganismo disminuye la

gravedad de los síntomas clínicos (Farber, 1991). De todas maneras, estos estudios no ayudan a determinar la dosis infectiva mínima en humanos, pero los datos publicados en relación a la carga microbiana de los alimentos contaminados con *Listeria monocytogenes* responsables de brotes de intoxicación alimentaria, tanto epidémicos como esporádicos, ofrecen habitualmente recuentos superiores a 100 ufc/g (Swaminathan *et al.*, 2007), generalmente concentraciones superiores a  $10^3$  ufc/g (FAO, 2004). Incluso se afirma, aún a riesgo de generalizar demasiado, que para que se produzca la enfermedad son necesarias concentraciones de al menos  $10^5$ - $10^6$  ufc/g de alimento (Capita-González, 1997), lo que supone una dosis infectiva relativamente alta. También diferentes evaluaciones de riesgo realizadas (FAO/OMS, 2004, FDA/FSIS, 2003 y Lindqvist y Westöö, 2000), a pesar de las limitaciones que se han puesto de manifiesto en los modelos dosis-respuesta empleados, sugieren que la mayor parte de los casos de listeriosis humana se producirían como consecuencia de la exposición de población susceptible a muy pocas porciones de alimento que contienen niveles elevados de *L. monocytogenes*.

En contraposición a estas afirmaciones, hay documentado en 1998 en Estados Unidos un brote de intoxicación causado por unas salchichas frankfurt contaminadas con menos de 0,3 ufc/g *Listeria monocytogenes* (Mead, 2006). Sin embargo, hay que tener en cuenta el tiempo transcurrido entre la intoxicación y el análisis del alimento, que los procedimientos de recuento no son siempre totalmente fiables y la diferente distribución del patógeno en las porciones del alimento (FAO, 2004).

Aunque la hipótesis de la transmisión de la enfermedad por el consumo de alimentos fue apuntada por primera vez por Murray en 1926 y apoyada posteriormente por numerosos investigadores (Capita, 1998) no fue hasta 1981 cuando por un brote de listeriosis en Nueva Escocia, Canadá, se rastreó el microorganismo en una ensalada de coles (Schech, 1983) quedando confirmada dicha hipótesis. La mayor parte de las estimaciones sugieren el origen no zoonótico de la listeriosis humana y que la transmisión por vía alimentaria se produce en el 99% de los casos, si bien algunos autores rebajan

esta cifra hasta el 85% o el 69% (EFSA, 2008). Actualmente es considerada como la enfermedad de transmisión alimentaria emergente más importante de la última década, tanto desde el punto de vista de la salud pública como en la industria alimentaria, ya que, unido a la gravedad y mortalidad de la enfermedad que produce, se trata de un microorganismo ubicuo cuyas características de supervivencia lo hacen altamente resistente a condiciones ambientales extremas (tabla IV.I.). Las listerias son capaces de persistir durante largos periodos de tiempo adheridos a superficies y equipos, donde además pueden formar biofilms haciéndose muy resistentes a los agentes de limpieza y desinfección usados habitualmente. Además, se estima que *L. monocytogenes* forma parte de la microbiota intestinal de un 1 a 10% de la población (Forsythe, 2000).

**Tabla IV.I. Supervivencia de *Listeria monocytogenes* en condiciones ambientales adversas (Le Monnier y Leclerck, 2008).**

Medio	Tiempo de supervivencia (días)
Suelo	154 (~ 5 meses)
Heces de rumiantes	182-2190 (~ 6 meses – 6 años)
Aguas superficiales	35 (~ 1 mes)
Ensilado	180-2190 (~ 6 meses – 6 años)
Agua	790-928 (~ 2-3 años)

Otro dato de gran importancia es su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración, lo que determina que la cadena de frío constituya en si misma un factor de riesgo, contribuyendo al enriquecimiento selectivo de esta bacteria frente a otra microbiota acompañante. A temperaturas de refrigeración su tiempo de generación es de 30-40 horas, mientras que a 35°C es de aproximadamente una hora, presentando además una gran resistencia a elevadas concentraciones de sal y capacidad para multiplicarse adecuadamente en atmósferas modificadas.

Desde su confirmación como agente causal de enfermedad de transmisión alimentaria son numerosos los datos recogidos relativos a la incidencia actual de la enfermedad, que oscila entre uno y once casos anuales por millón de habitantes, dependiendo del país (Drevets y Bronze, 2008, Notermans *et al.*, 1998). En concreto, desde 1981 se han descrito varios brotes de origen alimentario, algunos de los cuales afectaron a un gran número de personas y tuvieron una duración prolongada: 122 enfermos en Suiza en los años 1985 a 1987, aproximadamente 300 enfermos en el Reino Unido en los años 1987 a 1989, y 279 enfermos en Francia en 1992 (Rocourt y Cossart, 1997).

Según los datos notificados en el año 2005 la incidencia media de listeriosis humana en los Estados miembros de la Unión Europea fue de tres casos anuales por cada millón de habitantes, habiéndose detectado un ligero aumento de la misma en los últimos años (EFSA, 2007a). En el año 2006 se registraron en la Unión Europea 1.583 casos diagnosticados de listeriosis humana y se produjeron 9 brotes de la enfermedad que afectaron a 120 personas. Esta tendencia creciente de la incidencia de la enfermedad en Europa, si bien en algunos casos puede asociarse a la mejora de los servicios de vigilancia y notificación, en términos generales parece ser un reflejo de un incremento real en el número de casos nuevos detectados cada año.

Concretamente en España entre los años 2004-2007 entre los brotes alimentarios, no hídricos, notificados al Sistema de Información Microbiológica se registraron un total de cinco brotes donde *Listeria monocytogenes* fue identificado como el agente causal de los mismos (CNE, 2008). Los datos referidos a los casos notificados en España en los últimos años se recogen en la tabla IV.II. (AESAN, 2009), donde puede ser observado un claro aumento en el número de casos desde el año 1999 hasta el 2007.

**Tabla IV.II. Casos de listeriosis en España (Servicio de Información Microbiológica, 2009).**

Año	Casos notificados al SIM		
	Total	Bacteriemia	Meningitis
1999	29	12	17
2000	31	10	21
2001	56	44	12
2002	47	29	18
2003	48	35	13
2004	100	-	-
2005	79	-	-
2006	79	-	-
2007	81	-	-

En cuanto al tipo de alimentos que más frecuentemente se ven implicados en la transmisión de *Listeria monocytogenes* destacan especialmente las carnes frescas y los productos cárnicos listos para el consumo, los productos lácteos, las hortalizas y los productos derivados del pescado (Farber y Peterkin, 1991, EFSA, 2006b). Pero son sin duda los alimentos listos para el consumo, los ya referidos como RTE, los que pueden considerarse más peligrosos desde el punto de vista de la transmisión de la listeriosis (Capita, 2008), aspecto que ha sido confirmado por numerosos estudios (Anonymous, 2002; Chen *et al.*, 2006) donde, entre todos los microorganismos patógenos, *Listeria monocytogenes* supone el riesgo más importante (Bover-cid *et al.*, 2010) debido a las especiales condiciones y características que el microorganismo reúne, enumeradas a continuación :

- está ampliamente difundido en el medio ambiente y resulta difícil de erradicar,
- puede crecer lentamente en muchos tipos de alimentos durante el periodo de almacenamiento,
- es una bacteria especialmente resistente a las condiciones y tratamientos usados habitualmente en el control de otros patógenos de transmisión alimentaria (CFSAN/FSIS, 2003).



Concretamente en el ámbito de la Unión Europea y en el de los productos cárnicos RTE desde el año 2005 se ha ido registrando un moderado incremento de las notificaciones por *Listeria monocytogenes* (RASFF, 2006), donde la mayor parte de las mismas estuvieron relacionadas con productos listos para el consumo como el salami, el jamón y los productos cárnicos cocidos. Como muestra de la importancia de este patógeno en la UE se muestran datos correspondientes a la incidencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos comercializados en la Unión Europea en la tabla IV.III.

**Tabla IV.III. Resumen de la incidencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos comercializados en la Unión Europea en el año 2007 (EFSA y ECDC, 2009).**

Tipo de producto	% de muestras con Lm* en 25g	% de muestras con > 100 ufc de Lm/g
Carnes y productos cárnicos de vacuno	1,8 <sup>1</sup>	0,7
Carnes y productos cárnicos de porcino	2,2	0,2
Carnes y productos cárnicos (de carnes rojas no especificadas)	2,5	0,6

\*Lm: *Listeria monocytogenes*. <sup>1</sup> En general los datos han sido obtenidos sobre muestras en las que se analizaba el cumplimiento de uno de estos dos criterios: ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25g o un límite de 100 ufc *Listeria monocytogenes* /g. Los porcentajes por tanto se refieren al cumplimiento de cada criterio.

Más específicamente, en el caso del **jamón** como alimento transmisor de *Listeria monocytogenes* la mayoría de los estudios afirman que las especiales características intrínsecas de baja actividad de agua y alta concentración de sal de este tipo de producto suponen un gran obstáculo en el crecimiento del microorganismo pero que podrían permitir su supervivencia (ICMSF, 1996a). Esta supervivencia es confirmada por algunos estudios que notifican la detección de este microorganismo en jamones curados, como el detectado por el FSIS en junio de 2002 (FSIS, 2002; Giavannini, 2006).

Por lo que respecta a los brotes de listeriosis tanto en jamón como en **embutidos**, hay documentado un brote de listeriosis de especial relevancia asociado al consumo de productos cárnicos loncheados y envasados registrado en Chile en marzo de 2009 (en Chile el término “*cecina*” es utilizado para definir a embutidos de carne y productos cárnicos en general (RAE, 1992)), en el cual tras una exhaustiva investigación se descubrió el origen del mismo en una empresa de elaboración de productos cárnicos loncheados, cuyo foco de transmisión parecía estar en la barra transportadora de los alimentos (Wikipedia, 2009; Cooperativa, 2009) contaminando, básicamente, productos como el jamón de cerdo y de ave. Posteriormente, y en muy poco tiempo, una cadena de supermercados retiró varios productos de elaboración propia, entre ellos longanizas y chorizos, al detectarse la presencia de *Listeria monocytogenes* en los mismos (Nación, 2009). Brotes específicos de listeriosis en embutidos hay varios bien documentados, como los asociados al consumo de salami en Estados Unidos (Schawtz *et al.*, 1989) y en Europa (Swaminathan y Gerner-Smidt, 2007). Por otro lado, el 65%, de la notificaciones de listeriosis hechas al RASFF durante el año 2005 estuvieron relacionadas con productos listos para el consumo como el salami, el jamón y los productos cárnicos cocidos (Marcos, 2007).

Específicamente en la **cecina** no hay documentados brotes de listeriosis, ni tampoco en productos afines de características muy similares a la misma como el charqui (o jerky) o el biltong (Naidoo y Lindsay, 2010). Sin embargo, al igual que en el caso del jamón, han sido documentadas prevalencias del 0,52% de *Listeria monocytogenes* en productos como el charqui en punto de venta (Levine *et al.*, 2001)

Por todo lo expuesto podemos considerar a *Listeria monocytogenes* como un patógeno ubicuo y bastante resistente que produce un cuadro infeccioso grave pero, afortunadamente, poco frecuente que afecta principalmente a grupos de riesgo como embarazadas, individuos muy jóvenes o muy ancianos o personas inmunodeprimidas. Dentro de los alimentos habitualmente asociados a brotes de listeriosis parecen destacar con especial

relevancia los RTE, y dentro de éstos los productos cárnicos listos para el consumo suponen un claro riesgo por el modo de transmisión de la bacteria.

El **objetivo** de este capítulo ha sido el valorar la evolución y supervivencia de *Listeria monocytogenes* al ser inoculada en tres productos cárnicos: chorizo, jamón y cecina, cuando estos se presentan loncheados y envasados, simulando una contaminación posterior al periodo de curación de los mismos. Se valoró paralelamente el efecto sobre la supervivencia de este microorganismo de dos sistemas de envasado distintos y de tres temperaturas de conservación diferentes para los correspondientes productos cárnicos inoculados.

## **IV.2. Materiales y métodos**

### **IV.2.1. Planificación del Challenge Test**

Para el desarrollo de este experimento se usaron tres tipos de productos: jamón, cecina de vacuno y chorizo.

Cada tipo de producto fue troceado en lonchas de 25 gramos sobre las que se inocularon 50 µl de una suspensión de *Listeria monocytogenes*. Las lonchas de producto así inoculadas se separaron en dos grupos distintos según fueron envasadas en dos tipos de atmósferas: a vacío y en atmósfera modificada con una composición de 20% CO<sub>2</sub>/80% N<sub>2</sub>, y conservadas como tres lotes distintos según la temperatura de almacenamiento: 3, 11 y 20°C.

Los muestreos microbiológicos se realizaron, para cada grupo y lote, repartidos de la siguiente manera:

- un grupo de muestras fue analizado a las dos horas de su inoculación para obtener recuento a tiempo cero y comprobar el correcto desarrollo del procedimiento

- para el resto de ellas, se siguió el mismo criterio establecido para en el capítulo III, realizándose los análisis en los siguientes días de muestreo: 1, 7, 14, 28 y 42 días, 3 y 6 meses después de la inoculación.

En cada día de muestreo se analizaron un total de 12 bolsas de un mismo producto, correspondiendo dos bolsas para cada tipo de envasado y temperatura de conservación. Un resumen de la organización del trabajo realizada para este capítulo queda recogido en la tabla IV.IV.

**Tabla IV.IV. Programación del experimental de evaluación de la supervivencia de *Listeria monocytogenes* inoculada en distintos productos cárnicos.**

	Producto	Envasado	Tª conservación	Días de muestreo
<b>Listeria monocytogenes</b>	<b>Chorizo</b>	Vacío	3°C, 11°C y 20°C	1,7,15,30,45,90,180
		Atmósfera 20%CO <sub>2</sub> /80%N <sub>2</sub>		
	<b>Jamón</b>	Vacío	3°C, 11°C y 20°C	1,7,15,30,45,90,180
Atmósfera 20%CO <sub>2</sub> /80%N <sub>2</sub>				
<b>Cecina</b>	Vacío	3°C, 11°C y 20°C	1,7,15,30,45,90,180	
	Atmósfera 20%CO <sub>2</sub> /80%N <sub>2</sub>			

#### IV.2.2. Descripción de las muestras

Al igual que en el capítulo anterior, para el desarrollo de este experimento se utilizaron los productos cárnicos descritos en el capítulo III: siete barras de chorizo cular, dos jamones y tres piezas de cecina, ya elaborados, elegidos según las características de calidad microbiológicas y físico-químicas descritas para el capítulo III.

Dichos productos tras su recepción en las instalaciones del ICTAL fueron conservados a refrigeración, a menos de 4°C, hasta su posterior análisis.

Los análisis físico-químicos y microbiológicos previos fueron realizados en conjunto para los capítulos III, IV y V, quedando descritos en el capítulo III de la presente Tesis.

#### **IV.2.3. Cepa y preparación del inóculo**

La cepa de *Listeria monocytogenes* utilizada en este estudio como inóculo pertenece a la colección de la ATCC, en concreto se trabajó con la cepa nº 4032.

La cepa se mantenía conservada a -30°C en crioviales con una mezcla de 0,5 ml de glicerol (Panreac) y 0.5 ml de caldo de cultivo TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid).

Para la preparación del inóculo, 0,1 ml de la cepa se transfirieron a 5 ml de Caldo de Triptona y Soja (TSB, Oxoid) en tubo, incubándose a 37°C durante 24 horas. De este tubo de recuperación se hizo otro pase de 0,1 ml a 5 ml de TSB en iguales condiciones de tiempo y temperatura. Posteriormente, de este último pase se hicieron diluciones decimales en Agua de Peptona Bacteriológica al 0,1% (BP, Oxoid) de las cuales 0,1 ml fueron sembrados en Agar Cromogénico Listeria (Oxoid) e incubadas a 37°C durante 24 horas, permitiendo conocer así la concentración del microorganismo en el tubo de partida. Por otro lado, del mismo último pase se transfirieron 0,1 ml a 5 ml de TSB incubado a 37°C durante 24 horas, tras las cuales de este tubo se hicieron las diluciones correspondientes en BP para obtener el inóculo. En todos los pases se realizaron siembras en estría sobre medio Agar Cromogénico Listeria (Oxoid) para comprobar la pureza del cultivo.

#### **IV.2.4. Preparación, inoculación y condiciones de almacenamiento de las muestras**

De cada producto cárnico, chorizo, cecina y jamón, se obtuvieron, en condiciones de esterilidad, muestras consistentes en lonchas de 25 gramos. En

cada loncha se practicó un corte intermedio que permitiese introducir el inóculo para conseguir, mediante este procedimiento, reproducir lo más fielmente posible las condiciones naturales de una posible contaminación, ya que así el inóculo del microorganismo quedaría en el corte de la loncha (en las bolsas conservadas con atmósfera modificada la inyección del gas suponía una separación de las mismas por la poca cantidad de producto depositada en cada una).

Los inóculos se realizaron mediante el depósito de 50 µl, de la dilución  $10^5$  recuperada de la cepa de *Listeria monocytogenes*, en cada loncha con la intención de modificar lo menos posible las características físico-químicas del producto (Pal, 2008) y obteniendo concentraciones finales del inóculo por gramo de producto entre  $10^3$  y  $10^4$  ufc/g (Claire *et al.*, 2003).

Las lonchas inoculadas fueron introducidas inmediata, individual y asépticamente en bolsas estériles (tamaño 120 x 250 mm) de poliamida/polietileno 20/100 (Industrias Pargon C.B. Salamanca. España) con un espesor total de 120 micras, esencia 115.80 g/m<sup>2</sup> y producción 8.64 m<sup>2</sup>/kg, una permeabilidad al oxígeno de 50 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23°C, al dióxido de carbono de 150 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23°C y al nitrógeno de 10 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23 °C y una permeabilidad al vapor de agua de 1,9 g/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23 °C con 85 % de r.F.

Las muestras así procesadas fueron envasadas una mitad a vacío (Technotrip, modelo EV-7.TD) y la otra mitad en atmósfera modificada, cuya composición (v/v) era 20% de dióxido de carbono, 80 % de nitrógeno (S.E. de Carburos Metálicos, S.A. España).

Las muestras inoculadas y envasadas fueron conservadas a distintas temperaturas: 3, 11 y 20°C.

En cada día de muestreo se trabajaba con las muestras por duplicado para cada producto, sistema de envasado y temperatura de conservación.

#### **IV.2.5. Análisis microbiológico de las muestras inoculadas**

Antes de empezar los análisis microbiológicos de cada punto de muestreo las bolsas fueron higienizadas por fuera con una toalla de papel humedecida en etanol al 70 % (v/v).

Para la detección y recuento de este patógeno se llevaron a cabo dos procedimientos distintos basados, en parte, en las especificaciones de las UNE-EN-ISO 11290-1 Y UNE-EN-ISO 11290-2, en todo caso siguiendo siempre como referencia de los procedimientos básicos microbiológicos las especificaciones de la APHA 2001 para el análisis microbiológico.

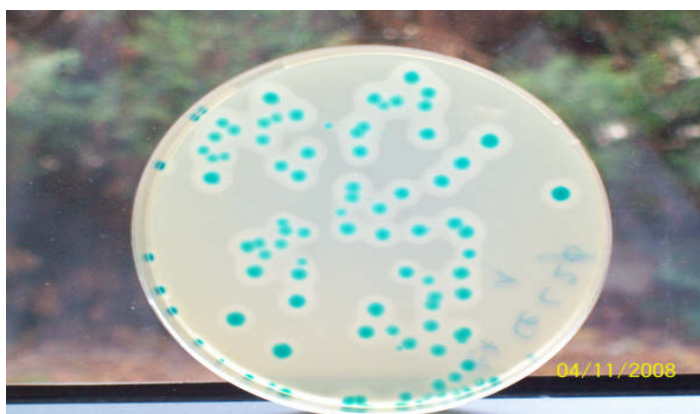
Para el recuento directo de *Listeria monocytogenes* se homogenizaron en stomacher (Masticator, IUL) durante 2 minutos los 25 g de producto en 225 ml de medio Fraser ½ (Fraser, Oxoid + 1 suplemento Fraser de Oxoid por cada litro de medio). Tras una revivificación de una hora a temperatura ambiente, de este homogenizado se sembraron, por duplicado y en superficie, 0,1 ml en placa con Agar Cromogénico Listeria (ISO Base, Oxoid) que se incubaron durante 24-48 horas a 37°C.

Para la detección de la presencia de este patógeno el homogenizado antes descrito contenido en la bolsa fue incubado durante 24 horas a 30°C. Posteriormente 1 ml de mismo, previa agitación de la bolsa, se pasó a un tubo de ensayo con 9 ml de medio Fraser 1 (Fraser, Oxoid + 1 suplemento Fraser de Oxoid por cada ½ litro de medio) de donde, tras una nueva incubación de 48 horas a 37°C, se tomó, previa agitación en vortex (Selecta), una gota de la suspensión con un asa de platino estéril, sembrándola en estría sobre Agar Cromogénico Listeria (ISO Base, Oxoid). Las placas fueron incubadas durante 24-48 horas a 37°C hasta observar o descartar la presencia de colonias.

Tanto para el recuento directo como para la detección de la presencia de esta bacteria, se consideraron como colonias de *Listeria monocytogenes* las que presentaban esta morfología: colonias redondas de un característico color azul-averdoso, resultante de la actividad  $\beta$ -glucosidasa común a todas las especies de *Listeria*, con bordes lisos y halo opaco blanco de precipitación alrededor de la colonia debido a la actividad de la enzima lecitinasa sobre la lecitina del medio, como puede verse en la figura IV.I.

**Figura IV.I. Morfología característica de colonias de *Listeria monocytogenes* en placa de Agar Cromogénico Listeria (Oxoid).**

Las colonias de la cepa de *Listeria monocytogenes* inoculada presentan un tamaño de pequeño a mediano, de color azulado, superficie lisa y brillante y con un característico halo de precipitación alrededor.



### **IV.3. Resultados**

#### **IV.3.1. Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero**

A las dos horas de la inoculación y tras su envasado a vacío y su conservación a refrigeración a 3°C o a temperatura ambiente a 20°C, se realizó un análisis microbiológico con objeto de valorar la evolución del inóculo y una detección precoz de posibles fallos. Se excluyeron de este análisis inicial las muestras envasadas en atmósfera modificada por el escaso efecto del gas en tan poco tiempo. Los resultados obtenidos se agrupan en la tabla III.V.



**Tabla IV.V. Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero de los productos inoculados con *Listeria monocytogenes*.**

Tª conservación muestra		20°C	20°C	3°C	3°C
<b>Producto</b>	<b>CHORIZO vacío</b>	4,33	4,54	4,35	4,51
	<b>JAMÓN vacío</b>	2,69	3	3,17	3,74
	<b>CECINA vacío</b>	3,29	3,09	3,20	3,25

#### **IV.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos del producto inoculado en los tiempos de muestreo**

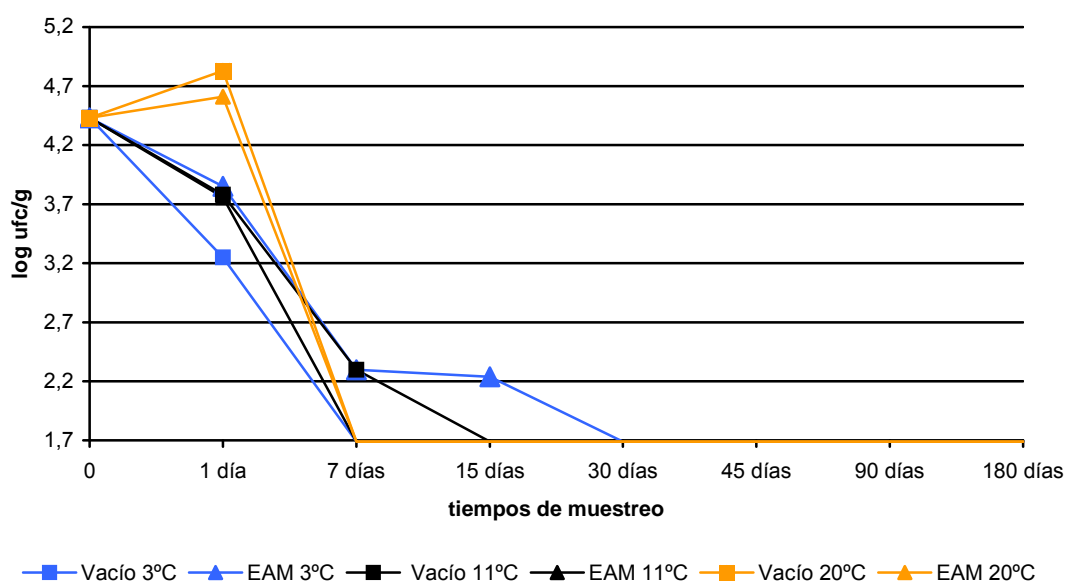
Los resultados de los análisis microbiológicos realizados en cada punto de muestreo quedan reflejados en las tablas y gráficos recogidos a continuación.

**Tabla IV.VI. Resultados de la evolución del recuento y detección de *Listeria monocytogenes* inoculada en chorizo.**

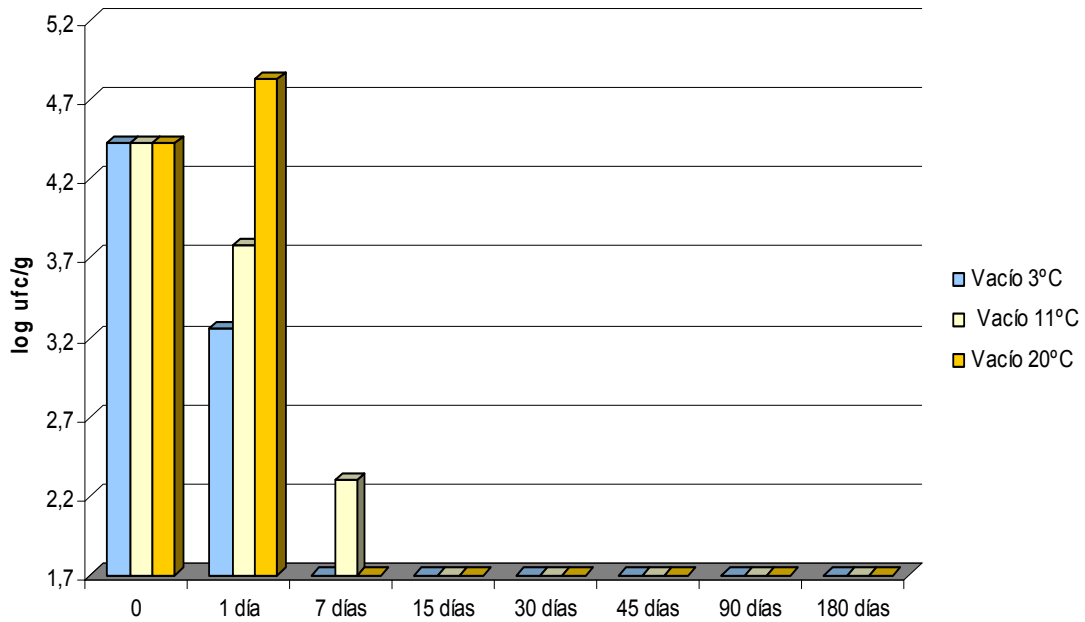
Chorizo		<i>Listeria monocytogenes</i>						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	3,43	P	P	P	P	1,70	P
		3,06	1,70	P	P	P	P	-
	EAM	3,77	2,30	2,17	P	P	P	-
		3,93	2,30	2,30	P	P	-	-
11°C	Vacío	3,69	P	P	P	P	P	P
		3,86	1,70	P	P	P	P	P
	EAM	3,83	2	P	P	P	-	-
		3,69	P	P	P	P	P	-
20°C	Vacío	4,71	P	P	P	P	P	-
		4,95	P	P	P	P	-	-
	EAM	3,85	P	P	P	P	-	-
		5,36	P	P	P	-	-	-

EAM: Envasado en Atmósfera Modificada. El dato numérico de cada punto de muestreo representa el logaritmo decimal del número de ufc/gramo presentes en la muestra. "P": presencia tras enriquecimiento. "-": Por debajo del límite de detección de la técnica, ausencia tras enriquecimiento.

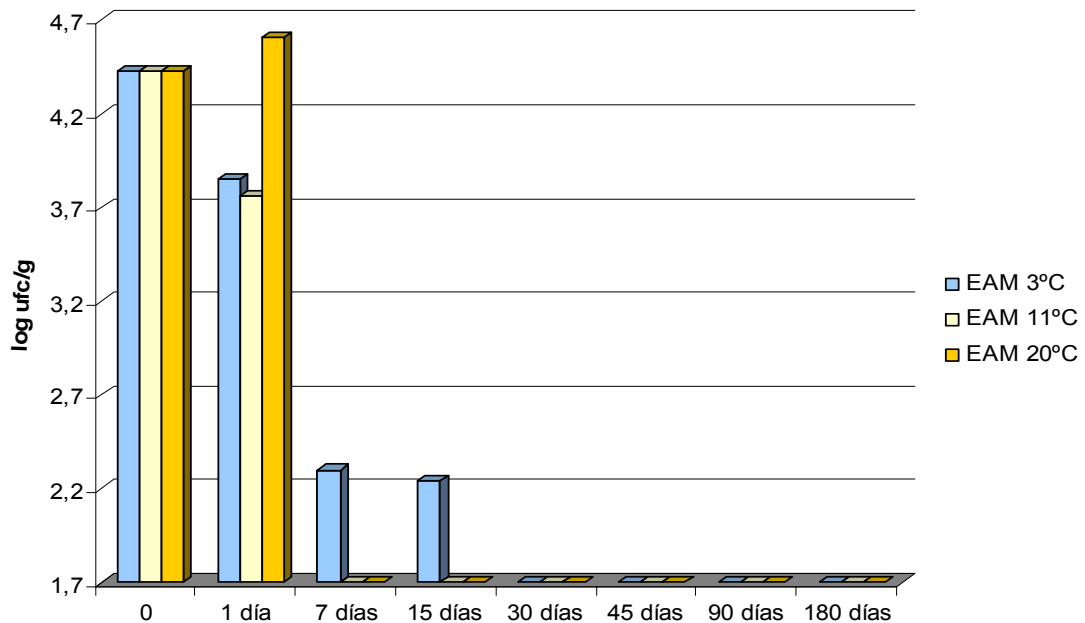
**Figura IV.II. Evolución de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en chorizo**



**Figura IV.III. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en el chorizo envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.**



**Figura IV.IV. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en el chorizo envasado en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.**

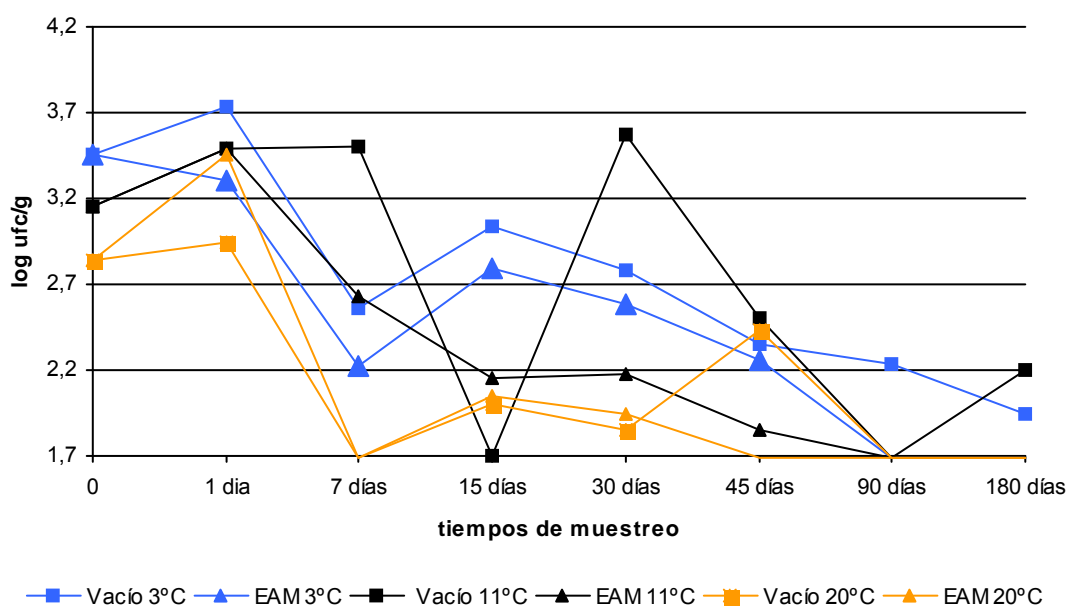


**Tabla IV.VII. Resultados de la evolución del recuento y detección de *Listeria monocytogenes* inoculada en jamón.**

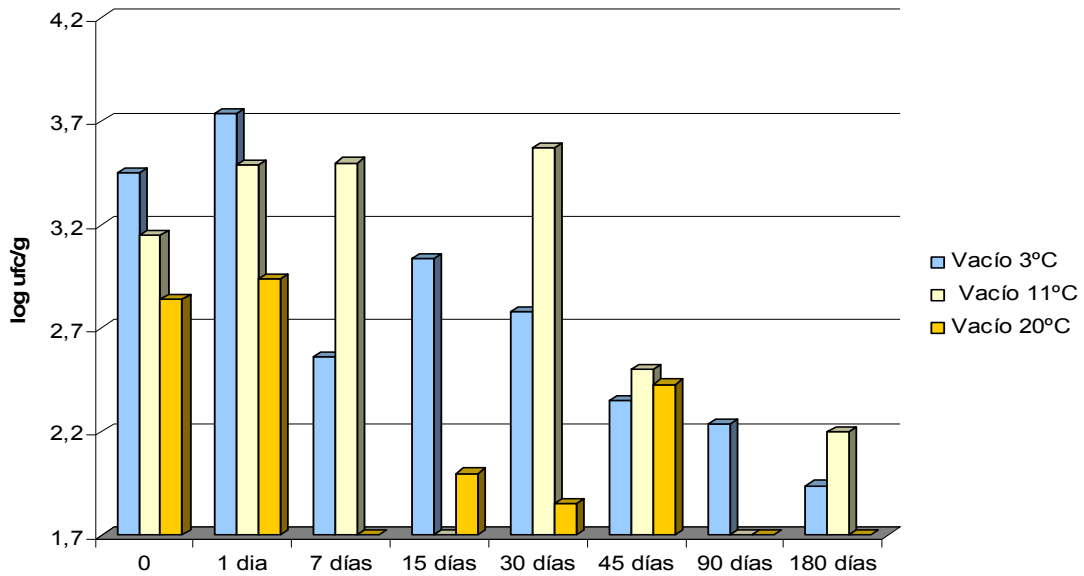
Jamón		<i>Listeria monocytogenes</i>						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	3,77	2,65	2,92	2,95	P	2,18	-
		3,71	2,54	3,15	2,60	3	2,30	2,18
	EAM	3,28	2,74	3,09	3,16	P	-	-
		3,31	1,70	2,48	2,00	2,81	P	-
11°C	Vacío	3,91	3,69	1,70	3,79	2,70	P	2,70
		3,07	3,30	P	3,34	2,30	P	-
	EAM	3,59	2,78	2,60	1,70	2,00	P	-
		3,39	2,47	P	2,65	P	P	-
20°C	Vacío	3,00	P	2,30	P	2,85	-	-
		2,88	P	P	2,00	2,00	-	-
	EAM	3,42	P	1,70	2,18	P	-	-
		3,51	P	2,39	P	P	-	-

EAM: Envasado en Atmósfera Modificada. El dato numérico de cada punto de muestreo representa el logaritmo decimal del número de ufc/gramo presentes en la muestra. "P": presencia tras enriquecimiento. "-": Por debajo del límite de detección de la técnica, ausencia tras enriquecimiento.

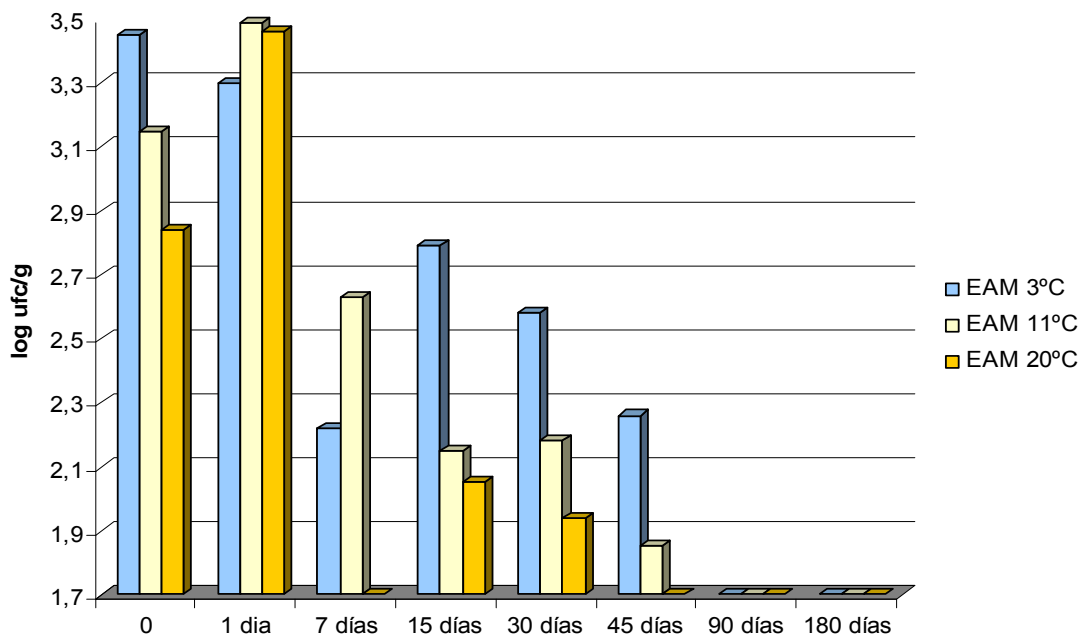
**Figura IV.V. Evolución de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en jamón**



**Figura IV.VI. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en el jamón envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.**



**Figura IV.VII. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en el jamón envasado en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.**

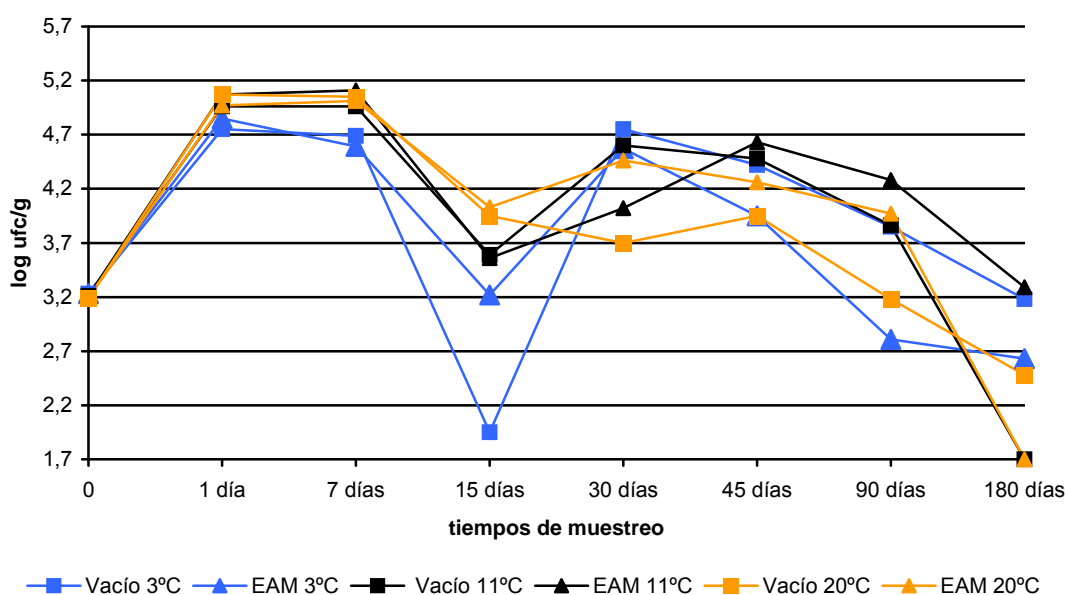


**Tabla IV.VIII. Resultados de la evolución del recuento y detección de *Listeria monocytogenes* inoculado en cecina.**

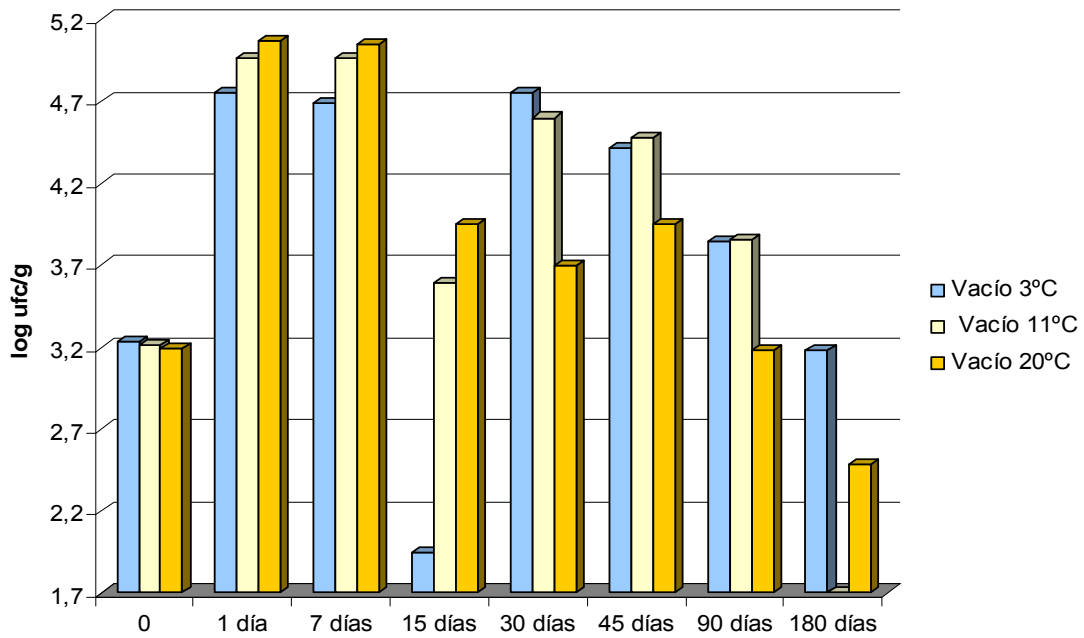
Cecina		<i>Listeria monocytogenes</i>						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	4,72	4,79	1,70	4,92	4,38	3,82	3,18
		4,77	4,59	2,19	4,57	4,45	3,88	3,18
	EAM	4,94	4,36	2,95	4,88	4,21	2,88	2,65
		4,76	4,82	3,49	4,26	3,69	2,74	2,60
11°C	Vacío	5,05	4,94	3,43	4,62	4,61	3,82	1,70
		4,86	4,97	3,75	4,58	4,34	3,89	1,70
	EAM	5,08	5,15	3,83	3,51	4,74	4,31	3,31
		5,06	4,69	3,28	4,53	4,51	4,25	3,28
20°C	Vacío	5,12	5,06	3,74	3,70	3,63	3,18	2,48
		5,01	5,04	4,15	3,70	4,27	3,18	2,48
	EAM	4,93	5,02	4,07	4,54	3,88	3,98	-
		5,00	4,99	3,99	4,38	4,64	3,95	-

EAM: Envasado en Atmósfera Modificada. El dato numérico de cada punto de muestreo representa el logaritmo decimal del número de ufc/gramo presentes en la muestra. "P": presencia tras enriquecimiento. "-": Por debajo del límite de detección de la técnica, ausencia tras enriquecimiento.

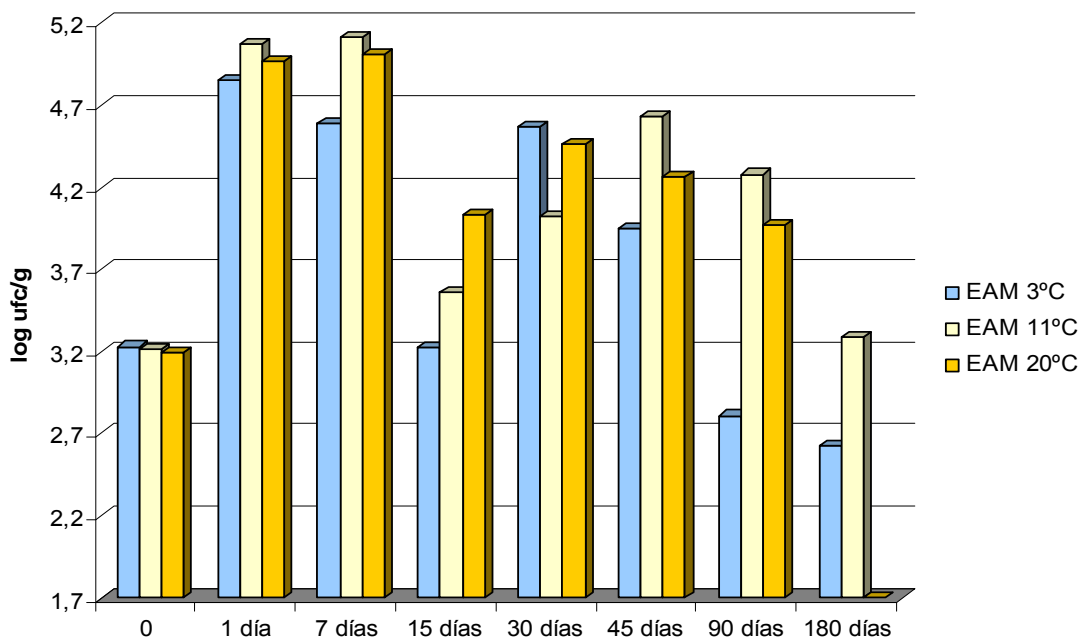
**Figura IV.VIII. Evolución de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en cecina**



**Figura IV.IX. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.**



**Figura IV.X. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Listeria monocytogenes* en la cecina envasada en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.**



#### IV.4. Discusión

Por lo que respecta al comportamiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en el **chorizo** inoculado y envasado, en nuestro experimento se observa, al igual que sucedió con *Staphylococcus aureus* en el capítulo anterior, una rápida disminución de la carga inicial de la bacteria. Como se puede ver en la figura IV.VI., tras presentar un comportamiento variable en el día uno de muestreo, con una disminución en la mayoría de las muestras excepto en las conservada a 20°C. En todas las demás condiciones de envasado y almacenamiento se produce una reducción de casi tres unidades logarítmicas a los siete días tras la inoculación. De hecho, como queda indicado en la tabla IV.VI., en este punto de muestreo *Listeria monocytogenes* sólo es detectada directamente, sin necesidad de enriquecimiento, en tres de las muestras conservadas a refrigeración y en dos de las conservadas a 11°C, con unos recuentos muy bajos. Estos resultados indican que las características de este producto, ya sean físico-químicas o microbiológicas inhiben el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y afectan claramente a su supervivencia.

En un estudio parecido al realizado por nosotros, donde se evaluaba el comportamiento de varias cepas de *Listeria monocytogenes* inoculadas sobre pepperoni tras su elaboración y loncheado y antes del envasado a vacío, con un inóculo inicial de entre 3 y 4 log ufc/cm<sup>2</sup>, y conservadas a 4, 12 y 25°C (Byelashov *et al.*, 2009), los resultados obtenidos son muy similares. En este caso cabe matizar que el pH medio de los productos está entre 4,5 y 4,8, inferior al de nuestro chorizo. Respecto a los resultados, en las distintas muestras se observa que el patógeno se inhibe más lentamente a 4°C que a 12 o 25°C. Y también que a 60 días todas las muestras se encuentran por debajo del límite de detección de la técnica, permaneciendo este comportamiento hasta los 180 días de almacenamiento.

Por otro lado, la presencia de *Listeria monocytogenes* tras un enriquecimiento previo es detectada en la mayoría de las muestras hasta el día



90 de muestreo, donde ya desaparece en casi todas las muestras correspondientes a los distintos tipos de envasado y temperaturas de conservación. Sólo se detectan a los 180 días tras la inoculación en una de las muestras envasada a vacío y conservada a 3°C.

Por lo que respecta a la influencia de la temperatura de conservación sobre la supervivencia de listeria, al contrario de lo observado en el capítulo II para *Staphylococcus aureus*, es a temperatura óptima de refrigeración, 3°C, donde a siete y 15 días se logran obtener recuentos directos de este microorganismo. Este aspecto corroboraría lo indicado en la introducción de este capítulo, que dada su capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración la cadena de frío puede ser en si misma un factor de riesgo. A este respecto resulta útil citar la investigación realizada por Lindqvist y Lindblad, 2009, sobre la inactivación de *Listeria monocytogenes* durante la maduración de *fermented sausages* en la cual también observaron que a temperaturas de 20°C o superiores el tiempo requerido para la reducción de una unidad logarítmica respecto al inóculo inicial es menor que a temperaturas de 8°C. En concreto a 8°C el tiempo requerido para esta reducción es de 16 días, mientras que a 20°C es de cuatro a siete días.

Por otro lado, no se observan diferencias significativas en el comportamiento de este patógeno entre los distintos sistemas de envasado. Este aspecto no debería influir mucho sobre su crecimiento ya que algunos autores indican que puede crecer con concentraciones de CO<sub>2</sub> de hasta el 50% y a vacío (Capita, 2009). Resulta oportuno citar la conclusión a la que llegan varios investigadores (García de Fernando *et al.*, 1995) en su revisión sobre el crecimiento y supervivencia de patógenos psicrotrofos en carne envasada en atmósferas modificadas. En ella, tras una exhaustiva revisión al respecto concluyen que el envasado en cualquier tipo de atmósfera modificada no parece suponer necesariamente un riesgo adicional para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en comparación con el envasado en condiciones aeróbicas.

Respecto a las características físico-químicas que controlan el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, las muestras de chorizo inoculadas (ver datos en tabla III.III. del capítulo III) presentan un pH medio, 4,99, que no supone un obstáculo importante para el crecimiento de este patógeno, cuyo rango de pH es relativamente amplio, entre 4,5 y 9 (Capita, 2009). El porcentaje medio de sal, 2,34%, tampoco afectaría mucho a esta bacteria, ya que son microorganismos con una alta resistencia a elevadas concentraciones de sal (Capita, 2009), capaces de crecer hasta con un 10% de sal. Sin embargo, en el caso de la actividad de agua del producto inoculado, 0,874, este parámetro sí que puede suponer un impedimento para el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. Parece bien establecido en 0,92 el límite de crecimiento de este patógeno (Nolan *et al.*, 1992), valor bastante superior, en términos de actividad de agua, al que presenta este alimento. Por lo tanto, podemos considerar a este último parámetro como un importante factor limitante e inhibidor del chorizo en el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

En el estudio realizado por Marcos en 2007 sobre el comportamiento de *Listeria monocytogenes*, inoculada en chorizo en la fase inicial del proceso de elaboración, se observó un efecto determinante del pH sobre el crecimiento de este patógeno cuando los valores de actividad de agua son todavía elevados. Por otro lado, tampoco en este estudio se observó crecimiento del patógeno durante la conservación a temperatura ambiente, sin embargo no citan que se haya producido una desaparición del mismo, como sí fue claramente manifestado en nuestra investigación. En este estudio se concluye que la actividad de agua final de este tipo de productos, 0,86-0,88, es determinante para la seguridad de los embutidos respecto al crecimiento de *Listeria monocytogenes*, conclusión similar a la expresada por nosotros. Otro aspecto a tener en cuenta, y también recogido en otros similares realizados sobre el efecto de los estárter comerciales (Työppönen *et al.*, 2003; Benkerroum *et al.*, 2003; Nieto-Lozano *et al.*, 2010) es la existencia de un factor antimicrobiano adicional en este producto, las bacteriocinas. Estas se consideran determinantes para la seguridad de los embutidos frente a *Listeria monocytogenes*, y frente a otros patógenos como el *Staphylococcus aureus*.

El comportamiento de *Listeria monocytogenes* inoculada sobre el **jamón** loncheado y envasado en distintas atmósferas es bastante diferente a la evolución observada en el chorizo. Como puede observarse en la figura IV.III., tras un ligero incremento en el día uno de muestreo respecto al inóculo inicial también se produce un marcado descenso de los recuentos a siete días tras la inoculación, llegando a desaparecer en las muestras conservadas a 20°C. Sin embargo, en este caso a los 15 días se llega a producir un ligero aumento en los recuentos en las muestras envasadas en atmósferas modificadas y conservadas a 3 y 20°C. En esta última temperatura incluso tras su desaparición en el punto de muestreo anterior, no desaparece completamente, incluso tras un enriquecimiento previo, hasta el día 90 de muestreo. En el resto de temperaturas y sistemas de envasado se pueden observar una disminución gradual de los recuentos tras el día 15 de muestreo, existiendo algunas fluctuaciones especialmente para las muestras envasadas a vacío y conservadas a 11°C. Los resultados obtenidos parecen indicar que el control que ejerce este producto sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes* es inferior al observado para el chorizo, y que las características físico-químicas o microbiológicas de jamón no afectan tan manifiestamente como las del chorizo a la supervivencia del patógeno.

Por otro lado, la presencia de *Listeria monocytogenes* tras el enriquecimiento previo, en las muestras en las que no se obtiene un recuento directo, es detectada en casi todas las muestras hasta el día 90 de envasado, excepto para las conservadas a 20°C. Sólo a 180 días de la inoculación no se recupera este patógeno excepto en dos muestras, una conservada a 3°C y otra 11°C, ambas envasadas a vacío, en las que se obtiene un recuento directo.

Por lo que respecta a la influencia de la temperatura de conservación sobre la supervivencia de la listeria inoculada en jamón, las temperaturas de refrigeración favorecen el recuento directo o su detección tras un enriquecimiento de este patógeno. Por lo que también en este producto se corrobora que su carácter psicrotrofo supondría que la cadena de frío en si

misma puede suponer un factor de riesgo, pues se observan incrementos en los recuentos tras esa brusca disminución a 7 días del envasado.

En cuanto a la influencia de los sistemas de envasado en el comportamiento de *Listeria monocytogenes* inoculada sobre el jamón, en este caso sí que puede apreciarse, ver figuras IV.V. y IV.VI., una ligera diferencia entre el envasado a vacío y en atmósfera modificada. En este último sistema de envasado, en la evolución de la bacteria inoculada a partir del día 15 de muestreo se observa una disminución gradual de los recuentos, desapareciendo en los puntos de muestreo a 90 y 180 días. Sin embargo, en las muestras conservadas a vacío se producen más variaciones en las muestras conservadas a 11 y 20°C, con ligeros aumentos en los recuentos. Las muestras conservadas a 3°C muestran una evolución más gradual, similar a lo observado en las muestras envasadas en atmósferas modificadas. A este respecto, los estudios recogidos en la recopilación ya citada de García de Fernando *et al.*, 1995, son bastante controvertidos, ya que para algunos autores (Zhao *et al.*, 1992; Wimpfheimer *et al.*, 1990; Marshall *et al.*, 1991) esta bacteria no se ve inhibida por el envasado en atmósferas modificadas, sin embargo Gill y Reiche, 1989 y Hudson *et al.*, 1994 han demostrado que el envasado en estas atmósferas inhibe su crecimiento. Por otro lado, su capacidad para crecer en productos envasados a vacío ha quedado bien demostrada en los estudios realizados por Grau y Vanderlinde, 1990, Sheridan *et al.*, Laack *et al.*, 1993 y Hudson *et al.*, 1994. En el caso del jamón, en nuestro estudio el envasado en atmósferas modificadas parece tener un efecto inhibitor mayor que el observado para el envasado a vacío sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes*.

Respecto a las características físico-químicas del jamón (ver tabla III.III.) que pueden afectar al crecimiento de *Listeria monocytogenes*, las muestras inoculadas tienen un pH medio, 5,69, que al igual que sucede con el chorizo, no suponen un factor de control sobre el crecimiento de este patógeno. En cuanto al porcentaje medio de sal, 3,73%, tampoco afecta a su supervivencia, pues presenta una elevada tolerancia a la sal. Y en cuanto a la actividad de

agua, 0,888, al igual que sucede con el chorizo, este parámetro sí supone un obstáculo importante en el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, que como ya fue indicado, presenta un límite de crecimiento de 0,92, muy superior a la media obtenida para el jamón inoculado (Nolan *et al.*, 1992). Pero, respecto a este último punto, en un estudio realizado sobre la prevalencia en el jamón de Parma de *Listeria monocytogenes* por Prencipe *et al.* publicado en 2012 se indica que la  $a_w$  en este tipo de producto induce una considerable inhibición del patógeno. Pero también hay que indicar que no es capaz de eliminarlo definitivamente. En esta misma publicación se refieren a un ensayo realizado en Italia en la que se inocularon jamones curados y en el que se demostró que para lograr una efectos de inactivación los valores de actividad de agua requeridos son inferiores a 0,9 (Grisenti *et al.*, 2004).

Por último, sobre la evolución del inóculo de *Listeria monocytogenes* en la **cecina**, es en este producto donde se produce una significativa diferencia en el comportamiento de este patógeno respecto a lo observado para el chorizo y el jamón. Partiendo de un inóculo inicial medio en torno a 3,21 log ufc/g, en el día uno de muestreo se observa un sorprendente crecimiento del microorganismo sobre la muestra, llegando a 5 log ufc/g en prácticamente todas las muestras. Este recuento se mantiene estable en el día siete tras la inoculación. En este producto, la gran disminución del patógeno se observa a partir del día 15 de muestreo, frente al día siete observado en el chorizo y el jamón. Más preocupante es que tras este descenso se detecta una notable recuperación en todas las muestras, manteniéndose los recuentos en niveles entre 3 y 4 log ufc/g hasta el día 90 de muestreo. Se recuperó por recuento directo en cantidades próximas a 100 ufc/g en casi todas las temperaturas y sistemas de envasado a 180 días, excepto en las muestras envasadas en atmósfera modificada y conservadas a 20°C, donde no hay recuentos directos ni tampoco consigue recuperarse tras el enriquecimiento previo.

Por todo lo descrito en el párrafo anterior, el comportamiento de este patógeno sobre la cecina en la contaminación tras el loncheado y en el envasado resulta preocupante, teniendo en cuenta los altos recuentos

obtenidos, que en muchos puntos de muestreo se sitúan entre 4 y 5 log ufc/g. Especialmente si lo relacionamos con la dosis infectiva, que aunque sin datos epidemiológicos concluyentes y teniendo en cuenta la variabilidad que aporta el factor individual del infectado y la virulencia de la cepa, que se sitúa por encima de las 100 ufc/g referenciadas por Swaminathan *et al.*, 2007, y en los límites de los  $10^5$ - $10^6$  ufc/g de alimentos indicadas por Capita-González, 1997. Teniendo en cuenta estas referencias, los productos inoculados en este estudio supondrían un peligro especialmente para los individuos de riesgo: enfermos de sida, ancianos, mujeres gestantes y personas con tratamientos inmunosupresores. También es preciso señalar que los datos de contaminación por *Listeria monocytogenes* de las muestras de cecina analizadas en punto de venta en el capítulo II de este mismo trabajo de investigación, son siempre sensiblemente inferiores a la tasa de inoculación utilizada en este *Challenge Test*.

Por lo que respecta a la influencia de la temperatura de conservación sobre la supervivencia de la listeria, en la cecina no se observa este efecto tan marcado de las diferencias de temperatura sobre los recuentos observados, como sí sucede en el chorizo y el jamón. Incluso en este caso se observan diferencias respecto a la temperatura de conservación en función de la atmósfera de envasado. Como puede observarse en las figuras IV.VIII. e IV.IX., a partir del día 30 de análisis en las muestras envasadas a vacío las conservadas a 20°C presentan unos recuentos menores. Sin embargo, en las muestras envasadas en atmósferas modificadas los recuentos obtenidos a partir del día 45 son menores en las muestras conservadas a 3°C respecto a las otras temperaturas. Por último, otro aspecto sorprendente, en relación a lo observado en los otros productos, es que la disminución producida en los recuentos del día 15 tras la inoculación es mayor en las muestras conservadas a 3°C, lo que podría deberse a su crecimiento más lento a temperaturas de refrigeración (Swaminathan *et al.*, 2007; Capita; 2009) tras una disminución de la población.

Respecto a las características físico-químicas de la cecina inoculada, pH entre 5,69-5,75, porcentaje de sal entre 3,88-4,39 y actividad de agua entre 0,903-0,863, ninguno de estos factores ejerce un control, ni individual ni sinérgico, sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. En nuestros resultados ni estos pH ni estas concentraciones de sal suponen un obstáculo importante para el crecimiento de este patógeno. Sin embargo, la actividad de agua establecida como límite del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en 0,92 por Nolan *et al.*, 1992, y aceptada por numerosos autores (Swaminathan *et al.*, 2007 y Capita, 2009), no es compartida por nosotros basándose en los resultados del presente experimental. Nuestros resultados son más acordes con los aportados por Grisenti *et al.*, 2004, en su ensayo sobre el jamón, que demuestran que para lograr un efecto de inactivación los valores de actividad de agua requeridos son inferiores a 0,9. Por otro lado, Swaminathan *et al.*, 2007, también indican que el mínimo de actividad de agua para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* es 0,93, pero que algunas cepas pueden crecer a valores tan bajos como 0,9.

Debemos indicar la ausencia en la bibliografía consultada de Challenge Test de *Listeria monocytogenes* en cecinas de vacuno.

A modo de conclusión general sobre el comportamiento de *Listeria monocytogenes* inoculada en nuestro experimental sobre estos tres tipos de productos: chorizo, jamón y cecina, el chorizo es el que mejor efecto de control ejerce sobre el patógeno. En el caso de la cecina, sin embargo, la contaminación durante el loncheado y envasado del producto supone un peligro potencial, según lo observado en nuestro estudio. Este producto no sólo no controla el crecimiento del patógeno, sino que permite su crecimiento hasta en dos unidades logarítmicas, llegando a niveles que se establecen como umbral de la dosis infectiva para este microorganismo. Respecto a la temperatura de conservación, el frío parece mostrarse como un factor más de riesgo en el caso del chorizo y el jamón. La cecina vuelve a presentar un comportamiento diferente frente a las temperaturas de conservación y a la atmósfera de envasado. Tras 15-30 días de envasado, los recuentos difieren

en las mismas temperaturas para los dos sistemas de envasado. Por último, para los tres productos evaluados no se observan diferencias muy significativas entre ambas atmósferas de conservación, aunque resultados algo más elevados parecen encontrarse entre las muestras conservadas en atmósfera modificada.





## **CAPÍTULO V**

**Evaluación de la supervivencia de  
*Clostridium sporogenes*,  
como apatógeno de *Clostridium botulinum*,  
inoculado en productos cárnicos  
loncheados y envasados en distintas atmósferas**



## V.1. Introducción

Por lo que respecta a *Clostridium botulinum*, éste es el causante de la intoxicación alimentaria conocida como botulismo, cuyos síntomas los causan las extremadamente peligrosas neurotoxinas que esta bacteria produce y que son consideradas como los venenos orgánicos más potentes de los que se tiene conocimiento (Arnon *et al.*, 2001). Este microorganismo, perteneciente al género *Clostridium*, miembro de la familia *Bacillaceae*, es un bacilo, de forma recta o ligeramente curvada, Gram-positivo anaerobio estricto y esporulado (Cato *et al.*, 1986; Düre, 2005), cuyas esporas son ovales, subterminales y distienden el soma bacteriano dándole una forma característica (Johnson *et al.*, 2007), móvil por medio de flagelos peritricos.

Este bacilo fue aislado por primera vez en 1895 por Emile van Ermengem (van Ermengem, 1979) quien la denominó como *Bacillus botulinus*. Posteriormente, mediante la investigación de nuevos brotes se comprobó que aunque los síntomas de la enfermedad eran similares en todos ellos, el agente causal difería de la cepa inicial aislada por van Ermengem, tanto en sus características de cultivo como en los requerimientos para su crecimiento, (Leuchs, 1910) por lo que a medida que se realizaban nuevos aislamientos, mediante el desarrollo de pruebas cruzadas de neutralización de las distintas toxinas fue siendo clasificando en diferentes serotipos toxigénicos: A y B (Burke, 1919), C y D (Bengston, 1922; Seddon, 1922; Thieler *et al.*, 1927), E (Gunnison *et al.*, 1935), F (Møller and Scheibel, 1960) y G (Giménez y Ciccarelli, 1970). En 1953, Prévot propuso agrupar todos los serotipos causantes de botulismo bajo una única denominación, *Clostridium botulinum*, lo cual fue controvertidamente aceptado, dadas las claras diferencias metabólicas existentes entre cepas, por el Manual Bergey en su edición de 1986 (Cato *et al.*, 1986). Posteriormente se propusieron modificaciones a la misma debido a los resultados obtenidos en estudios de la secuencia del ARN ribosomal 16s (Hutson *et al.*, 1993; Collins *et al.*, 1994) que establecen la correspondencia entre grupos genéticamente distintos y los grupos metabólicos o fenotípicos observados, aspecto también confirmado por otras técnicas de biología

molecular como la hibridación del ADN o los PFGE (Johnson, 2005a; Johnson, 2005b). La tendencia actual, y ampliamente aceptada, es dividir la especie *C. botulinum* en cuatro grupos fenotípicos denominados grupo I, II, III y IV (Franciosa, 2003; Johnson, 2007), donde el serotipo G (o grupo IV) fue renombrado como *Clostridium argentinense* (Suen *et al.*, 1988). Por otro lado han sido identificadas cepas aisladas de *Clostridium butyricum* y *Clostridium baratii* o *barati*\* (\*pie de tabla V.I.) capaces de producir neurotoxinas botulínicas y que han sido propuestas como grupos V y VI (Franciosa, 2003). Recientemente también ha sido documentada una nueva cepa de *Clostridium*, denominada RKG, que, presumiblemente, produce una neurotoxina parecida a las producidas por *Clostridium botulinum* (Dixit *et al.*, 2005). Sin embargo, un aspecto que debe ser tenido en cuenta a respecto de estos grupos es la demostrada capacidad de algunas cepas de *Clostridium botulinum* para producir mezclas de dos tipos de toxinas como A+F, A+B o B+F (Hatheway, 1992). Aspectos de la actual clasificación y de las principales características de los grupos fenotípicos quedan recogidos en las tablas V.I. y V.II.

**Tabla V.I. Resumen de los grupos toxigénicos de *Clostridium botulinum* y de sus principales características (Peck *et al.*, 2004).**

Microorganismo neurotoxigenico	Neurotoxinas	Asociado a		Microorganismo equivalente no neurotoxigenico
		Intoxicación alimentaria	Botulismo infantil	
<b><i>C.botulinum</i> tipo I</b> proteolítico	A, B, F	+++	+++	<i>C. sporogenes</i>
<b><i>C.botulinum</i> tipo II</b> no proteolítico o sacarolítico	B, E, F	+++	-	sin nombre**
<b><i>C.botulinum</i> tipo III</b>	C, D	-	-	<i>C. novy</i>
<b><i>C. argentinense</i> o tipo IV</b>	G	-	-	<i>C. subterminale</i>
<b><i>C. baratii</i>*</b>	F	+	++	
<b><i>C. butyricum</i></b>	E	+	++	

+++ Comúnmente, ++ raramente, + muy raramente asociado, - no se conocen casos asociados a intoxicación alimentaria o botulismo infantil. \**baratii* en autores como Bell y Kyriakides, 2005 y Johnson, 2007, 140 entradas en [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) y 6900 entradas en Google, *barati* en autores como Hielm, 1999, 103 entradas en [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) y 11700 entradas en Google. \*\* Cepas no toxigénicas, probablemente como consecuencia de la pérdida espontánea del gen BoNT, has sido aisladas en laboratorios de investigación no habiendo sido designadas con un nombre específico (Hatheway, 1992; Collins and East, 1998).

**Tabla V.II. Principales características de los subgrupos de *Clostridium botulinum* (Bell y Kyriakides, 2005).**

Propiedades	Grupo fenotípico			
	I	II	III	IV
Tipo neurotoxina	A, B, F	B,E, F	C, D	G
Proteolítico*	Sí	No	No o débilmente	Débilmente
Sacarolítico	No	Sí	No	No
Lipolítico	Sí	Sí	Sí	No
Psicrotrofo	No	Sí	No	No

\*Proteolisis: digestión de caseína, proteínas séricas, carne o huevo coagulado

En cuanto al botulismo, la enfermedad causada por las neurotoxinas producidas por este microorganismo, aunque conocida desde hace milenios (Hielm, 1999) e incluso ya reconocida como tal durante el reinado del emperador bizantino León VI (886-911 d.C.) (Dolman, 1964; Johnson, 2007), no fue recogida por la literatura científica hasta 1820 cuando Justinius Kerner documentó hasta 230 casos de intoxicación por el consumo de salchichas en Alemania y demostró experimentalmente que la toxina causante de la enfermedad había sido producida dentro de la salchichas y que la ausencia de aire era la condición necesaria para que fuese sintetizada (Johnson, 2005b). Posteriormente, fue en 1870 cuando le fue dado el nombre de botulismo, procedente del término *botulus*, en latín salchicha, por Müller, quien lo describió como una nueva enfermedad (Dolman, 1964).

Esta enfermedad, el botulismo, es una severa afección neuromuscular cuyo síntoma clínico distintivo se caracteriza por una parálisis del músculo esquelético flácida, simétrica, bilateral y descendente (Cherrington, 2004), cuyos otros síntomas más comunes son debilidad general, diplopía, visión borrosa, midriasis y fotofobia (síntomas debidos a la temprana afectación de los nervios craneales, sobre todo la inervación ocular), dificultades para tragar y hablar, estreñimiento, náuseas y vómitos. Es una enfermedad poco frecuente pero muy grave, con una elevada tasa de mortalidad que afortunadamente ha ido descendiendo desde un 70% en siglos anteriores hasta un actual 10% en

los países desarrollados (CDC, 1998; Shapiro *et al.*, 1998), aunque se estima que el ratio mundial estimado de caso/mortalidad es del 20% (Hatheway, 1995). Este descenso de la mortalidad se ha debido a las nuevas terapias basadas el tratamiento con antitoxina en los primeros momentos de la enfermedad, antes de que ésta se una a los receptores neuromusculares (Arnon *et al.*, 2006), y, sobre todo, a los modernos sistemas de soporte vital mediante ventilación mecánica (Cherington, 2004). De todas maneras presenta largos periodos de convalecencia y recuperación de entre semanas y meses (Johnson, 2007), ya que el bloqueo de la liberación del neurotransmisor acetilcolina causado por esta toxina es irreversible, y la curación es debida a una progresiva y lenta reinervación fisiológica (Brin, 1997). El periodo de incubación varía entre unas horas y 8 o 10 días en función del tipo de botulismo, el serotipo de la toxina y la cantidad de la misma, aunque frecuentemente está comprendido entre 1 y 3 días. Actualmente, se reconocen principalmente 6 tipos de botulismo (Hatheway, 1995; CDC, 1998; Cherington, 2004) en función de la vía de entrada de la toxina al organismo, que son:

- *botulismo de transmisión alimentaria o clásico*, producido por la ingestión de la toxina preformada en el alimento
- *botulismo de las heridas o “del cazador”*, causado por la colonización de una herida abierta por esporas de *Clostridium botulinum*, donde produce la toxina que es distribuida vía linfática o sanguínea al el resto del organismo
- *botulismo del lactante*, asociado a la ingestión de esporas, generalmente presentes en miel o jarabes azucarados contaminados, que coloniza el, todavía poco inmune, intestino infantil produciendo en él la toxina. El *botulismo intestinal adulto*, variante en la que esporas del microorganismo coloniza el intestino de un adulto, debido generalmente a una anormalidad o patología previa
- *botulismo por inhalación*, enfermedad profesional descrita muy pocas veces (von Holzer, 1962; CDC, 1998) y vía de transmisión fehacientemente demostrada mediante la investigación de brotes documentados en primates no humanos y ensayos sobre animales (Pitt y LeClaire, 2005), que es motivo de gran preocupación, junto con la vía alimentaria, por su posible uso como arma biológica (IDSA, 2009)

- *botulismos de fuente desconocida*, que encuadra aquellos casos donde la vía de entrada al organismo o la fuente de la toxina no llega a descubrirse
- *botulismo inadvertido o iatrogénico*, la forma más reciente de la enfermedad asociada a pacientes tratados con toxina botulínica por motivos ya sean terapéuticos o estéticos (Sobel, 2005).

El botulismo “intencional”, ya sea por inhalación o ingestión oral de la toxina en caso de ser usada como agente de bioterrorismo, podría llegar a considerarse como un séptimo tipo de botulismo con muy graves consecuencias (.Caya *et al.*, 2004; Johnson y Montecucco, 2008) y motivo de preocupación de muchas agencias de defensa de los gobiernos actuales.

Por lo que respecta al botulismo de transmisión alimentaria, ésta es la vía de intoxicación más frecuente y preocupante, causada por la ingestión de la toxina previamente producida en el alimento bajo adecuadas condiciones de crecimiento: anaerobiosis, pH superior a 4,6, temperaturas superiores a los 3°C y menos del 15 % de sal (Domínguez, 2005), por células vegetativas de *Clostridium botulinum*, o muy raramente por otras especies de *Clostridium*. Estas toxinas son liberadas al medio por lisis celular, aunque algunos estudios de microscopía electrónica parecen contradecir esta teoría, habiendo sido establecida la hipótesis de que algunas cepas son capaces de excretar la toxina (Montecucco y Schiavo, 1994; Rao *et al.*, 2007). Aunque se distinguen 7 tipos serológicos de neurotoxinas producidas por *Clostridium botulinum*, tipos A-G, la toxina C dividida en dos tipos, C<sub>10α</sub> y C<sub>20β</sub>, siendo esta última una citotoxina que actúa alterando la permeabilidad vascular (Pérez *et al.*, 2003), y varios subtipos han sido descritos (Peck *et al.*, 2011), la inmensa mayoría de los casos de botulismo alimentario están causados por los tipos BoNT/A, BoNT/B y BoNT/E, y raramente por el tipo BoNT/F (Shapiro *et al.*, 1998; Franciosa *et al.*, 2003; Gupta *et al.*, 2005). Recientemente algún brote de botulismo ha sido asociado a cepas de *C. butyricum* botulinogénicas (Tsukamoto, 2002). La tabla V.III. recoge las principales características de crecimiento y resistencia de las esporas de los dos grupos fisiológicos más frecuentemente implicados en el botulismo alimentario, los grupos I, o



proteolíticos, y II, o no-proteolíticos. Una norma, ciertamente paradójica, es que la cepas proteolíticas suelen estar implicadas en casos de botulismo asociado al consumo de por productos vegetales, mientras que las no proteolíticas frecuentemente se asocian al botulismo transmitido por alimentos proteicos (Hatheway, 1995; Hielm, 1999).

**Tabla V.III. Características de los dos grupos fisiológicos de *Clostridium botulinum* más habitualmente implicados en el botulismo alimentario (Peck *et al.*, 2004).**

	Grupo I o proteolítico	Grupo II o no proteolítico
Tipo de neurotoxina	A, B, F	B, E, F
pH mínimo de crecimiento	4,6	5,0
Temperatura mínima de crecimiento	10-12°C	3°C
Concentración máxima tolerable de sal	10%	5%
Resistencia de los esporos a 100°C	>15 minutos	<0,1 minutos
Alimentos habitualmente implicados	Conservas caseras, o comerciales defectuosas	Productos marinos fermentados o desecados

Todas las neurotoxinas producidas por *Clostridium* tienen en común su estructura, formada por un péptido de cadena sencilla de 150 a 170 kDa que posteriormente es dividido en dos fragmentos, una cadena pesada H de ~100 kDa y otra ligera L de ~50 kDa, unidos por un puente disulfuro, siendo el segmento H el responsable de la unión al tejido nervioso y el L el que tiene actividad intracelular, inhibiendo la liberación del neurotransmisor acetilcolina y causando así la parálisis flácida. La producción de los diferentes tipos de BoNTs está codificada por sus correspondientes genes BoNT, localizados en el cromosoma bacteriano, salvo para los tipos C y D que están localizados en un bacteriofago y el tipo G en un plásmido (Johnson, 2000). Por otro lado, estos 7 tipos serológicos de toxina sólo son neutralizados por su correspondiente antitoxina, teóricamente sin neutralización cruzada, aunque pequeñas

neutralizaciones cruzadas han sido observadas entre los tipos BoNT/C y BoNT/D y los tipos BoNT/E y BoNT/F (Smith y Sugiyama, 1988).

La toxina botulínica es un péptido relativamente termolábil, ya que 100°C durante 10 minutos separa sus cadenas con la pérdida total de toxicidad, resistente parcialmente hasta pH de 2,5 y que se descompone en pH alcalinos. También se ve afectada su estabilidad por el aire, la luz y algunos agentes químicos como el permanganato y el yodo, pero se conserva bien a 0°C y se liofiliza con facilidad (Domínguez, 2005).

Respecto a la dosis infectiva, es un dato sobresaliente que las toxinas botulínicas son el compuesto orgánico más tóxico conocido de los que bastarían 100 kg, equitativamente distribuidos, para matar a toda la humanidad (Domínguez, 2005). La ingestión de la neurotoxina preformada, en concreto del tipo BoNT/A, en tan poca cantidad como 30 nanogramos es suficiente para causar la enfermedad e incluso la muerte (Peck *et al.*, 2004) y el consumo de 0.1g de alimento contaminado con esta cantidad causaría botulismo (Lund y Peck, 2000), siendo la dosis tóxica para humanos algo mayor, en torno a 10µg, para los tipos BoNT/E y BoNT/F. Desde otro punto de vista, se ha observado que la duración de la enfermedad, además de depender de la cantidad de toxina ingerida, está relacionada con el tipo de toxina implicada, produciéndose convalecencias más largas en la intoxicaciones producidas por BoNT/A, y en orden decreciente por BoNT/B, BoNT/F, y BoNT/E (Foran *et al.*, 2003), aspecto demostrado tanto en modelos animales como mediante el estudio de casos de botulismo alimentario en humanos.

Desde la identificación de *Clostridium botulinum* como microorganismo causante del botulismo se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre su distribución en el ambiente y las posibles fuentes de contaminación de los alimentos. Ya en 1922 fueron examinados terrenos, muestras de vegetales y de piensos de Estados Unidos encontrándose que hasta el 30% de las muestras eran positivas a la presencia del microorganismo (Topley y Wilson, 1929). Posteriores investigaciones en otros países y continentes (Cann *et al.*,

1965; Smith *et al.*, 1978; Smith y Young, 1980; Hauschild, 1989; Hielm *et al.*, 1998) permitieron conocer la distribución ambiental de los diferentes serotipos de *Clostridium*. En ellas concluyeron que es un microorganismo de naturaleza ubicua ampliamente disperso en el medio ambiente, tanto en los ambientes acuáticos como terrestres, por su capacidad de adoptar formas de resistencia (Bell y Kyriakides, 2005; Johnson, 2007). También se evidenció que el serotipo E es realmente un microorganismo acuático que no procede del suelo terrestre y que el serotipo A es más frecuente en el oeste de Estados Unidos y en Asia y el B en Europa y el este de Estados Unidos. La información obtenida en estos estudios además ha mostrado que la incidencia del botulismo depende en gran manera de la prevalencia y los niveles de contaminación de esporas de *Clostridium botulinum* en el ambiente local, ya que la probabilidad de germinación, crecimiento y producción de toxina en los alimentos se incrementa exponencialmente con una elevada carga microbiana en los materiales crudos (Genigeorgis, 1981), por lo que las regiones geográficas con elevada prevalencia de esporos de *Clostridium botulinum* generalmente experimentan una mayor incidencia de casos de botulismo que las regiones donde se detectan bajas concentraciones de esporos (Dodds, 1993a; Dodds, 1993b). Este aspecto ya fue descubierto en los años 50 en los pioneros estudios epidemiológicos llevados a cabo por Meyer, quien concluyó que el riesgo de botulismo era mayor en regiones con una alta incidencia de esporas del tipo A, B y E (Meyer y Eddie, 1950; Meyer, 1956).

Con más de 3.353 brotes y 9.767 casos documentados en todo el mundo entre 1951-1989 el botulismo alimentario es todavía el más frecuente de los tipos de botulismo (Hauschild, 1993; Hielm, 1999), siendo especialmente endémico en determinadas regiones del mundo (Franciosa *et al.*, 2003) y bastante raro en muchos países. Esta particularidad podría ser debida además de a la propia distribución ambiental del microorganismo, aspecto ya comentado, a los hábitos alimentarios de las distintas naciones (Bell y Kyriakides, 2005), pues frecuentemente se asocia a determinados alimentos como por ejemplo ocurre con el consumo de determinados productos de origen marino en Alaska, Canadá o Japón (Hauschild, 1993). Por otro lado, debe ser

tenido en cuenta que aunque poco frecuente es, como muchas otras, una enfermedad de transmisión alimentaria cuya incidencia mundial está indudablemente infravalorada debido por un lado a que los casos leves no son correctamente diagnosticados y se encuadran como otros desordenes neurológicos, y por otro, al sistema de detección y notificación en aquellos países donde no hay un adecuado sistema de sanidad pública (Fox *et al.*, 2004).

En lo relativo a la incidencia actual del botulismo alimentario, los datos más recientes corresponden a los recogidos en Estados Unidos, donde se estima que en la pasada década se diagnosticaron anualmente entre 25 y 50 casos (Sobel *et al.*, 2004) para una población cercana a los 310 millones de habitantes, donde, aproximadamente, un 60% de los casos son debidos al tipo A, un 18% al tipo B y un 22% al tipo E.

En Europa, en una reciente investigación sobre la incidencia de esta enfermedad llevada a cabo en Rumania (Neghina *et al.*, 2010) los datos recogidos mostraron que la media del número de casos por año es de 1,5 para una población de South West Romania de 2.301.833 habitantes (Dumitrascu y Dumitrescu, 2010), estando habitualmente implicado el tipo B, observándose además una ostensiblemente mayor incidencia entre las personas procedentes del medio rural (Neghina *et al.*, 2010).

Por lo que respecta a la incidencia del botulismo alimentario en España, investigaciones pasadas, como la realizada por Hauschild en 1993, recogen que entre los años 1969 y 1988 se declararon un total de 63 brotes, con 198 afectados, donde el tipo B fue identificado en el 93% de los casos. Recientemente, en la última acción concertada de la Unión Europea sobre el género *Clostridium* se señala que en España la media de casos de botulismo alimentario anuales está en torno a 10 casos/año y los productos generalmente implicados son conservas caseras de vegetales (Peck *et al.*, 2004). Por otro lado, en el resumen de los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en España entre los años 2004-2007 emitido por el Centro Nacional de

Epidemiología se refleja que fueron detectaron 10 brotes de botulismo en ese periodo de tiempo, y en el boletín semanal nº 18 del mismo organismo se recoge que durante el año 2009 fueron detectados 8 casos de botulismo de transmisión alimentaria (CNE, 2010).

Respecto al tipo de alimentos implicados en casos de botulismo, aunque los brotes de botulismo causados por alimentos producidos industrialmente tienen particular importancia, son muy infrecuentes tanto en Estados Unidos (país donde la información sobre *Clostridium botulinum* y el botulismo está más actualizada y es de fácil acceso) como en otros muchos países (Glass y Johnson, 2002; Bell y Kyriakides, 2005), ya que más del 90% del botulismo alimentario es debido a comidas o conservas caseras (Hatheway, 1995). Aunque un tipo de brotes a tener en cuenta son los asociados a comidas preparadas en restaurantes, habiendo sido documentados en varias regiones del mundo (Glass y Johnson, 2002).

La naturaleza ubicua del microorganismo da lugar a una potencialmente amplia contaminación de una gran variedad de productos, pero son también aspectos como el cocinado y los métodos de conservación de los alimentos los que juegan también un importante rol en la epidemiología del botulismo alimentario. Para que una intoxicación alimentaria por *Clostridium botulinum* suceda es unánimemente reconocido que deben reunirse las siguientes cuatro condiciones:

- las materias primas crudas deben estar contaminadas con esporos del microorganismo, ya sea procedentes del medio ambiente o durante el procesado
- el procesado del alimento debe permitir que sobrevivan un número suficiente de esporos
- que las condiciones del alimento permitan la supervivencia y crecimiento del *C. botulinum* durante el almacenamiento del mismo
- y que el alimento se consuma sin un adecuado calentamiento previo (Eklund, 1992; Siegel, 1992; Hielm, 1999; IDSA, 2009).

Concretamente, un amplio espectro de alimentos se han visto asociados en brotes epidémicos de botulismo (Bell y Kyriakides, 2005), como por ejemplo distintos tipos de queso, yogures, ajos en conserva, patatas, cacahuetes, y muchos tipos de pescados y carnes. En el presente trabajo de investigación resultan de especial interés aquellos brotes relacionados con productos cárnicos como embutidos y salazones cárnicas. En concreto, en Europa Central y del Este las intoxicaciones causadas por el tipo B debidas al consumo de **jamones** curados inadecuadamente salados han sido la forma predominante de botulismo alimentario, y también numerosos brotes han sido documentados en el oeste de Europa (Hauschild, 1993). Como fruto de las investigaciones realizadas sobre estos brotes fue sugerido que el retraso en la penetración de la sal es lo que permite el crecimiento y la toxicogénesis de cepas de *C. botulinum* no proteolíticas presentes en la profundidad de las piezas (Lücke *et al.*, 1982). Por otro lado, revisiones más recientes han implicado a los productos caseros tradicionales obtenidos del cerdo, entre ellos el jamón, en más del 93,1% de los casos de botulismo alimentario de regiones concretas de Rumania (Neghina *et al.*, 2010). En España hay documentado por lo menos un brote de botulismo, en el año 1987, donde se haya identificado al jamón curado como fuente del mismo (Anónimo, 1988; Lund y Peck, 2000). Otro más reciente que, supuestamente, implicaba a un jamón curado producido a escala industrial no ha podido ser confirmado mediante fuentes oficiales aunque si trascendió a los medios de comunicación (20 minutos, 2006).

Por lo que respecta a la **cecina** existe muy poca documentación internacional sobre brotes de botulismo causados ni por este producto ni por otros similares como el charqui o el biltong, aunque como ya fue citado anteriormente, un brote de botulismo producido por este producto fue documentado y registrado oficialmente en el año 2005, donde un lote, aunque se sospecha que el origen esté en una única pieza, producido a escala industrial fue implicado en tres casos de botulismo en Vigo (AESAN, 2005).

En el caso de los **embutidos** cárnicos fermentados como el chorizo o el salami no ha sido encontrada ninguna documentación sobre brotes que

impliquen directamente a este tipo de productos en brotes de botulismo. Este hecho parece refrendar su largo historial de seguridad microbiológica, aunque un tipo de “mosaic salami” aparece recogido como fuente de algún caso de botulismo en Rumania, en el mismo artículo anteriormente citado para el jamón (Neghina *et al.*, 2010). Por otro lado, son numerosas las investigaciones llevadas a cabo sobre el posible potencial de crecimiento y de producción de toxina en salamis (Kueper y Trelease, 1974; Christiasen *et al.*, 1975; Normal y Gudding, 1975; Lücke *et al.*, 1983;) y ninguna de ellas ha demostrado la producción de toxina por parte de *Clostridium botulinum* si estos son fermentados y secados correctamente (Bell y Kyriakides, 2005).

Por otro lado, un aspecto común a estos tres tipos de productos cárnicos, que creemos motivo de preocupación, es la actual tendencia al envasado en atmósferas modificadas, especialmente a vacío, dado que aunque se mantengan bajo refrigeración, lo cual todavía no parece estar plenamente reconocido para estos productos (observación propia de la autora en algunos pequeños establecimientos de venta al consumidor y en gran cadena de distribución, última observación en diciembre de 2011), se darían las condiciones que podrían seleccionar el desarrollo de los anaerobios psicrotrofos como el grupo II de *Clostridium botulinum*, incrementando el riesgo de botulismo (Johnson, 2007), aunque brotes de botulismo relacionados con este tipo de productos todavía no han sido documentados.

A modo de resumen se puede concluir que *Clostridium botulinum* es un microorganismo ubicuo cuyas esporas están dispersas con relativa frecuencia en el medio ambiente, que produce la toxina orgánica más letal conocida cuya presencia en los alimentos produce un grave cuadro patológico denominado botulismo. Los brotes producidos por algunos productos cárnicos que contienen la toxina están sólidamente documentados y el riesgo de su desarrollo y toxicogénesis en los distintos tipos de envasado, especialmente a vacío, debería ser objeto de estudio.

Además de datos recogidos en esta introducción sobre *Clostridium botulinum*, otro aspecto de especial relevancia para este estudio es el uso de **microorganismos apatógenos o sustitutos (*surrogate microorganisms*)**, los cuales permiten evaluar los efectos y respuestas de microorganismos patógenos similares frente a determinados tratamientos y procesos alimentarios. Su uso está ampliamente aceptado y difundido (Busta *et al.*, 2003), jugando un importante papel como alternativa biológica que reproduce las propiedades de supervivencia y crecimiento de los patógenos. El uso *surrogate microorganisms* es de especial utilidad para garantizar la seguridad en el trabajo, ya que no crea problemas o compromete la rutina habitual del laboratorio de análisis, ni las condiciones habituales de la industria cuando los experimentos se llevan a cabo en áreas normales de producción.

El microorganismo apatógeno ideal sería una cepa no virulenta del patógeno a estudio que retenga todas las otras características excepto la patogenicidad (Busta *et al.*, 2003). Los *surrogates microorganisms* generalmente son escogidos entre una población aceptablemente conocida de organismos con unas características bien definidas y un largo historial de ausencia de patogenicidad. Las características más deseables en la selección del microorganismo sustituto son:

- ausencia de patogenicidad
- comportamiento similar al del microorganismo objeto de estudio: cinéticas de inactivación, sensibilidad al pH, ...
- de fácil preparación, rindiendo densas poblaciones en el cultivo
- población constante tras su preparación
- de fácil recuento mediante sistemas económicos
- fácilmente diferenciable de la microbiota acompañante
- genéticamente estable.

En el caso concreto de *Clostridium botulinum*, dado que se trata de microorganismo especialmente peligroso, el uso de *Clostridium sporogenes* como apatógeno del mismo está ampliamente documentado y ensayado. Especialmente por la ausencia de toxicidad y por que sus requerimientos



fisiológicos son muy similares al *C. botulinum* (Luechapattanaporn, Y.W., *et al.*, 2004). *Clostridium sporogenes* es considerado, concretamente, el homólogo no toxigénico del grupo I de *C. botulinum*, mostrando una alta homología, del 99,7%, se la secuencia del ARNr (Hutson *et al.*, 1993).

*Clostridium sporogenes* es un gram-positivo esporulado, G+C 26%, con una temperatura de crecimiento óptima entre 30-40°C. Fermenta la glucosa y la fructosa a butirato, acetato, etanol, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>, siendo su sustrato de elección los aminoácidos, que son fermentados mediante la “reacción de Stickland” (Holt, 1986).

A consecuencia de todo lo expuesto anteriormente, el **objetivo** propuesto para este capítulo ha sido el valorar la evolución de *Clostridium sporogenes*, como *surrogate microorganism* de *Clostridium botulinum*, inoculado en tres productos cárnicos: chorizo, jamón y cecina, cuando estos se presentan loncheados y envasados, simulando una contaminación posterior al periodo de curación de los mismos. Se valoró paralelamente el efecto sobre la supervivencia de esta bacteria de dos sistemas de envasado distintos y de tres temperaturas de conservación diferentes en los correspondientes productos inoculados.

## **V.2. Material y métodos**

### **V.2.1. Planificación del *Challenge Test***

#### **V.2.1.1. Planificación de las inoculaciones y análisis correspondientes**

Para el desarrollo de este experimento también se usaron tres tipos de productos: jamón, cecina de vacuno y chorizo.

En este ensayo de inoculación sobre la cecina, dado que fue el producto implicado en el brote que dio origen a parte del desarrollo de esta Tesis, se utilizaron dos concentraciones distintas de inoculación, 10<sup>5</sup> y 10<sup>2</sup> ufc/g.

La concentración más baja de inóculo sigue la línea de otras investigaciones realizadas con este patógeno, que recomiendan inóculos en torno a 100 ufc/g en Challenge Test con la intención de obtener un adecuado margen de seguridad (Baker y Genigeorgis, 1990; Hyytiä *et al.*, 1999). Por otro lado, concentraciones bajas de inóculo son apropiadas ya que los estudios realizados sobre los niveles de esporas presentes en los alimentos han estimado que, generalmente, son bajos en las carnes, menos de 10 esporas por kg y, a menudo, menos de 1/kg (Dodds, 1993b). Por lo tanto esta tasa de inoculación reproduciría mejor la contaminación habitual de estos alimentos.

Respecto a la concentración alta de inóculo, se siguió este criterio también por dos motivos. Por un lado, está basado en los estudios realizados por otros autores (Meng y Genigeorgis, 1993) que pretender comparar el efecto de distintas concentraciones de esporos sobre su potencial de crecimiento. Y por otro, en la bibliografía consultada sobre brotes alimentarios de botulismo, hemos encontrado una referencia relativa a la concentración de esporos en el producto implicado, en concreto un Mascarpone que sobre las muestras retiradas del mercado se comprobó que contenían niveles de *C. botulinum* tipo A que superaban los  $10^5$  por gramo (Bell y Kyriakides, 2005).

En cada día de trabajo un tipo de producto fue troceado en lonchas de 25 gramos sobre las que se inocularon 50 µl de una suspensión de *Clostridium sporogenes*. Las lonchas de producto así inoculadas se separaron en dos grupos distintos según fueron envasadas en dos tipos de atmósferas: a vacío y en atmósfera modificada con una composición de 20% CO<sub>2</sub>/80% N<sub>2</sub> y conservadas como tres lotes distintos según la temperatura de almacenamiento: 3, 11 y 20°C.

Los muestreos para el análisis microbiológico se realizaron sobre cada lote repartidos de la siguiente manera:

- un grupo aparte de muestras fue analizado a las dos horas de su inoculación para obtener recuento a tiempo cero y comprobar el correcto desarrollo del procedimiento
- para el resto de ellas, se siguió el mismo criterio establecido para en el capítulo III, realizándose los análisis en los siguientes puntos de muestreo: a los 1, 7, 14, 28 y 42 días, 3 y 6 meses después de la inoculación.

En cada día de muestreo se analizaban, por microbiología clásica y por PCR, un total de 12 bolsas de un mismo producto, 2 por cada tipo de envasado y temperatura de conservación. Un resumen de la organización del trabajo realizada para este capítulo queda recogido en la tabla V.V.

**Tabla V.IV. Programación del experimental de evaluación de la supervivencia de *Clostridium sporogenes* inoculado en distintos productos cárnicos.**

<b><i>Clostridium sporogenes</i></b>	<b>Producto</b>	<b>Envasado</b>	<b>Tª conservación</b>	<b>Días de muestreo</b>
	<b>Chorizo 10<sup>2</sup></b>	Vacío	3°C, 11°C y 20°C	1,7,15,30,45,90,180
		Atmósfera 20%CO <sub>2</sub> /80%N <sub>2</sub>		
	<b>Jamón 10<sup>2</sup></b>	Vacío	3°C, 11°C y 20°C	1,7,15,30,45,90,180
Atmósfera 20%CO <sub>2</sub> /80%N <sub>2</sub>				
<b>Cecina 10<sup>2</sup> y 10<sup>5</sup></b>	Vacío	3°C, 11°C y 20°C	1,7,15,30,45,90,180	
		Atmósfera20%CO <sub>2</sub> /80%N <sub>2</sub>		

### V.2.1.2. Planificación e implementación de la técnica de PCR

Dado que para el desarrollo de este capítulo se implementó la técnica de PCR como sistema de detección de *C. sporogenes*, se planificaron una serie de experimentos que nos permitiesen conocer aspectos previos a la aplicación de la misma.

En un primer momento se determinó el límite de detección del protocolo de PCR, propuesto en el apartado V.2.6.2., sobre células vegetativas de la cepa de *Clostridium sporogenes* inoculadas en caldo TPGY y en caldo TPGY con la muestra tras su homogeneizado, para conocer la influencia que el caldo y los componentes del alimento puedan tener sobre el límite de detección.

Posteriormente, fue determinado el límite de detección de este protocolo de PCR para los esporos de *Clostridium sporogenes* inoculados, sobre caldo TPGY y sobre la matriz alimentaria, tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY (enriquecimiento siguiendo el método microbiológico recogido el apartado V.2.5).

### **V.2.2. Descripción de las muestras**

Al igual que en los dos capítulos III y IV del presente trabajo, para el desarrollo de este experimento se utilizaron los productos cárnicos descritos en el capítulo III: 7 barras de chorizo cular, 2 jamones y 3 piezas de cecina, ya elaborados, elegidos por las razones de calidad microbiológica y características físico-químicas descritas para el capítulo III.

Dichos productos, tras su recepción en las instalaciones del ICTAL, fueron conservados a refrigeración, a menos de 4°C, hasta su posterior análisis.

Los análisis físico-químicos y microbiológicos previos de las muestras fueron realizados en conjunto una vez, dado que son las mismas muestras para los capítulos III, IV y V, quedando descritos en el capítulo III de la presente Tesis.

### **V.2.3. Cepa y preparación del inóculo**

La cepa de *Clostridium sporogenes* utilizada en este estudio como inóculo pertenece a la colección de la CECT, en concreto se trabajó con la cepa nº 892, lote 06-03-2008.

Dicha cepa se mantenía conservada a -30°C en crioviales con una mezcla de 0,5 ml de glicerol (Panreac) y 0,5 ml de caldo de cultivo TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid).

En el caso de *C. sporogenes* el inoculó se realizó en forma de esporos (también denominados endoesporas, formas vegetativas de resistencia de algunos microorganismos procariotas), siguiendo las pautas marcadas en los trabajos anteriores tomados como referencia (Baker y Genigeorgis, 1990; Dodds, 1993b; Meng y Genigeorgis, 1993).

Para la obtención de un cultivo puro de esporos se utilizaron los dos protocolos, distintos, recogidos a continuación:

- a. El vial con el *Clostridium sporogenes* liofilizado fue resuspendido en un tubo de ensayo con 9 ml de medio TPGY (50 g de tripotona, 5 g de peptona, 4 g de dextrosa, 20 g de extracto de levadura y 1 g de tioglicolato sódico, todos de Oxoid) e incubado a 30°C en una jarra de anaerobiosis (BD Gaspaz Ez) con una atmósfera con menos del 1% de oxígeno y un porcentaje de dióxido de carbono entre el 9 y el 13% (AneroGen™, Oxoid) durante una semana para que se diesen las condiciones necesarias para la esporulación (Pérez *et al.*, 2005). Posteriormente, fue calentado a 80°C durante 10 minutos para lograr la destrucción de las células vegetativas y sobre el mismo se hicieron tres ciclos de centrifugación a 4000g (Eppendorf) durante 30 minutos a temperatura ambiente con lavados con agua bidestilada estéril entre centrifugaciones. El pellet así obtenido se resuspendió en 5 ml de agua bidestilada estéril y del mismo se hicieron diluciones decimales subsiguientes en agua de peptona al 0,1% (Oxoid) de las que se sembraron 0,1 ml en superficie en placas con TPGY, las cuales se incuban 3 días a 30°C en anaerobiosis, conociendo mediante recuento la concentración de esporos en la resuspensión.
- b. Por otro lado, para obtener una elevada concentración de esporos fue utilizado un procedimiento de múltiples etapas. Se inocularon 10 ml de

TPGY (igual composición que el anterior) con 0.5 ml de una suspensión congelada de células vegetativas y se incubaron durante 2 días a 30°C en una jarra de anaerobiosis en las mismas condiciones antes descritas. Posteriormente, 100 ml de caldo TPGY fueron inoculados con 1 ml del cultivo anterior e incubados en las mismas condiciones. Para obtener células vegetativas limpias el cultivo fue lavado 3 veces por centrifugación en una centrífuga (Eppendorf) a 4000 g durante 38 minutos y resuspendido en un tubo de 10 ml de medio de esporulación consistente en 60 g de triptona, 1 g de dextrosa, 1 g de tioglicolato sódico y 5 g de carbonato cálcico (Mah *et al.*, 2008) en un litro de agua destilada (Uehara *et al.*, 1965, Duncan y Foster, 1968, Lu, 2006). Después de una incubación de 10 días a 30 °C en una jarra de anaerobiosis, la suspensión fue calentada a 80°C durante 10 minutos para lograr la destrucción de las células vegetativas, posteriormente los esporos fueron lavados por el mismo procedimiento de centrifugación antes descrito y resuspendidos en M/15 fosfato tamponado Sörensen's (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5,675 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,63 g en un litro de agua destilada, pH 7,0) de la cual se hicieron diluciones decimales en el mismo medio tamponado obteniendo, tras la siembra de las mismas en TPGY y posterior incubación durante 2 días en las condiciones generales antes descritas, un recuento de 10<sup>8</sup> ufc/ml. La suspensión de esporas fue conservada a 4 °C siguiendo el criterio establecido por un estudio sobre la viabilidad de las esporas de *Clostridium sporogenes*, que determina que ésta es mayor a 4°C que a congelación (Mah *et al.*, 2008).

#### **V.2.4. Preparación, inoculación y condiciones de almacenamiento de las muestras**

De cada producto cárnico, chorizo, cecina y jamón, se obtuvieron, en condiciones de esterilidad, muestras consistentes en lonchas de 10 gramos. En cada loncha se practicó un corte intermedio que permitiese introducir el inóculo para conseguir, mediante este procedimiento, reproducir lo más fielmente posible las condiciones naturales de una posible contaminación, ya que así el

microorganismo quedaría en el pliegue del corte entre la loncha (en las bolsas conservadas con atmósfera modificada la inyección del gas suponía una separación de las mismas por la poca cantidad de producto depositada en cada una).

En un primer grupo de inoculaciones sobre cada loncha de los tres tipos de producto se depositaron 50  $\mu\text{l}$  de la dilución  $10^4$  de esporos, obtenidos mediante el proceso V.2.3.a. descrito en la preparación del inóculo, de la cepa de *Clostridium sporogenes*, con la intención de modificar lo menos posible las características físico-químicas del producto (Pal, 2008) y obteniendo concentraciones finales del inóculo por gramo de producto entre  $10^2$  y  $10^3$  ufc/gramo (Baker y Genigeorgis, 1990; Dodds, 1993b; Hyytiä *et al.*, 1997; Hyytiä *et al.*, 1999).

El segundo grupo de inoculaciones realizado sólo sobre la cecina se llevó a cabo mediante el depósito de 44  $\mu\text{l}$  de la dilución  $10^7$  de esporos de *Clostridium sporogenes*, obtenida siguiendo el procedimiento IV.2.3.b. descrito en la preparación del inóculo, en cada loncha con la intención de modificar lo menos posible las características físico-químicas del producto (Pal, 2008) y obteniendo concentraciones finales del inóculo por gramo de producto aproximadas de  $10^5$  ufc/g (Meng y Genigeorgis, 1993; Bell y Kyriakides, 2005).

Las lonchas inoculadas fueron introducidas inmediata, individual y asépticamente en bolsas estériles (tamaño 120 x 250 mm) de poliamida / polietileno 20 /100 (Industrias Pargon C.B. Salamanca. España) con un espesor total de 120 micras, esencia 115.80 g/m<sup>2</sup> y producción 8.64 m<sup>2</sup>/kg, una permeabilidad al oxígeno de 50 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23°C, al dióxido de carbono de 150 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23°C y al nitrógeno de 10 cm<sup>3</sup>/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23 °C y una permeabilidad al vapor de agua de 1.9 g/m<sup>2</sup> x bar x 24 horas a 23 °C con 85 % de r.F.

Las muestras así procesadas fueron envasadas una mitad a vacío (Technotrip, modelo EV-7.TD) y la otra mitad en atmósfera modificada, cuya

composición (v/v) era 20% de dióxido de carbono, 80 % de nitrógeno (S.E. de Carburos Metálicos, S.A. España). Esta composición y la proporción entre gases es la usada habitualmente en al industria alimentaria cárnica.

Las muestras inoculadas y envasadas fueron conservadas a distintas temperaturas: 3, 11 y 20°C.

En cada punto de muestreo se trabajaba con las muestras por duplicado para cada producto, sistema de envasado y temperatura de conservación.

#### **V.2.5. Análisis microbiológico de las muestras inoculadas**

Antes de empezar los análisis microbiológicos de cada punto de muestreo las bolsas fueron higienizadas por fuera con una toalla de papel humedecida en etanol al 70 % (v/v).

Posteriormente, tras el corte aséptico de la parte superior de la bolsa fueron depositados en su interior 90 ml de caldo TPGY (50 g de tripotona, 5 g de peptona, 4 g de dextrosa, 20 g de extracto de levadura y 1 g de tioglicolato sódico, todos de Oxoid) y la mezcla del producto inoculado con el caldo fue homogeneizada durante 2 minutos en stomacher (Masticator, IUL). De este homogenizado se hicieron las diluciones decimales correspondientes en agua de peptona al 1% (Oxoid) sembrándose en TPGY agar (igual composición del TPGY más 15 g de agar bacteriológico, todos ellos de Oxoid). Las placas sembradas y las bolsas con los homogenizados fueron incubados en jarras de anaerobiosis (BD Gaspaz Ez) con una atmósfera con menos del 1% de oxígeno y un porcentaje de dióxido de carbono entre el 9 y el 13% (AneroGen™, Oxoid) a 30°C durante 5 días. Tras este periodo de incubación, de las bolsas se tomaron, en condiciones de esterilidad, alícuotas de 10 ml que se conservaron a congelación para su posterior análisis mediante la técnica de PCR.



La morfología tipo de la colonia producida por la cepa de *Clostridium sporogenes* inoculada es la de una colonia de tamaño pequeño a mediano, de color cremoso a gris-amarillento, de superficie brillante y bordes filamentosos (Figura V.I.).

**Figura V.I. Morfología de colonias de *Clostridium sporogenes* en placa con medio TPGY.**



Morfología tipo de la colonia producida por la cepa de *Clostridium sporogenes* inoculada.

## **V.2.6. Técnica de PCR**

En este capítulo de la Tesis, además de las técnicas microbiológicas convencionales para la detección de microorganismos, se decidió establecer, implementar y valorar los resultados de la aplicación de la PCR como técnica de detección de *Clostridium sporogenes* en productos cárnicos.

### **V.2.6.1. Determinación del límite de detección de la PCR**

Para la correcta implementación de la técnica de PCR como método de detección de la presencia de esporas de *Clostridium sporogenes* en productos cárnicos, se establecieron previamente los límites de detección de la misma para células vegetativas y esporas del mismo, por un lado, sobre caldos de cultivo puro en medio TPGY y, por otro, sobre la matriz alimentaria.

En una primera prueba, para valorar la posible interferencia del medio de enriquecimiento sobre la técnica de PCR, en un tubo de ensayo con caldo TPGY (ver composición V.2.5) se depositó 1 ml de una suspensión de células vegetativas de *Clostridium sporogenes*, haciéndose diluciones decimales de la misma también sobre caldo TPGY. De esas mismas diluciones, 0,1 ml de cada dilución fueron sembrados por duplicado sobre TPGY agar e incubadas en la condiciones antes descritas (V.2.5.) para conocer la concentración microbiana de cada tubo. También, de cada tubo de dilución de TPGY se cogió 1 ml al cual se le aplicó la misma técnica de PCR descrita en el apartado continuo V.2.6.2. para la detección sobre las muestras con los pares de cebadores específicos de *Clostridium sporogenes*, tabla V.VI. del apartado V.2.6.2., y también, como puesta a punto de la técnica, se utilizaron un par de cebadores universales cuyas secuencias y protocolo de termociclado quedan recogidos en la tabla V.V.

**Tabla V.V. Primers universales usados en la puesta a punto de la técnica de PCR y su correspondiente protocolo de termociclado.**

Nombre	Secuencia (5'-3')	Fragmento amplificado	Referencia
16s1	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'	ARNr 16S	Lane, 1991
16s2	5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3'		

**Programación del termociclador para estos primers:**

1 ciclo: 94°C/3 minutos  
 29 ciclos: 92°C/30s; 55°C/30s; 72°C/90s  
 1 ciclo: 72°C/5min

Posteriormente, para conocer el posible efecto de la matriz alimentaria sobre los resultados obtenidos aplicando el protocolo de PCR, el mismo experimento con células vegetativas de *Clostridium sporogenes* recogido en el párrafo anterior se realizó pero, en este caso, sobre un homegeneizado de caldo TPGY y producto obtenido tras dos minutos en stomacher (Masticator, IUL).

Para conocer el límite de detección de la técnica de PCR sobre los esporos, en un tubo de ensayo con caldo TPGY (ver composición V.2.5) se depositó 1 ml de una suspensión de esporos de *Clostridium sporogenes*, haciéndose diluciones decimales de la misma también sobre caldo TPGY. De esas mismas diluciones, 0,1 ml de la cada fueron sembrados por duplicado sobre TPGY agar e incubadas en la condiciones antes descritas (V.2.5.) para conocer la concentración de esporos de partida. Posteriormente, la solución madre y las diluciones fueron incubadas en jarras de anaerobiosis (BD Gaspaz Ez) con una atmósfera con menos del 1% de oxígeno y un porcentaje de dióxido de carbono entre el 9 y el 13% (AneroGen™, Oxoid) a 30°C durante 5 días. Tras el enriquecimiento, de cada tubo de dilución de TPGY se cogió 1 ml al cual se le aplicó la misma técnica de PCR descrita en el apartado continuo V.2.6.2. para la detección del microorganismo con los pares de cebadores específicos de *Clostridium sporogenes*, tabla V.VI. del apartado V.2.6.2.

Por otro lado, se consideró oportuno hacer una siembra en placa TPGY agar de 0,1 ml de diluciones decimales de cada dilución tras la incubación, con el objetivo de conocer cuantas unidades formadoras de colonias se consiguen en cada dilución tras el enriquecimiento. Dichas placas sembradas fueron incubadas durante 2 días en las mismas condiciones descritas en V.2.5.

Por último, para conocer el número inicial de esporas de *Clostridium sporogenes* que son necesarias para que puedan ser detectadas por la técnica de PCR en un gramo de producto cárnico tras un enriquecimiento, una concentración conocida, mediante recuento en placa TPGY (V.2.5.), de esporas del microorganismo fueron inoculadas sobre 10 ml del líquido resultante de homogeneizados de 10 gramos de muestras de chorizo, jamón y cecina en 90 ml de caldo TPGY, y de las mismas se hicieron diluciones decimales también sobre los mismos homogeneizados, que posteriormente fueron incubadas en jarras de anaerobiosis (BD Gaspaz Ez) con una atmósfera con menos del 1% de oxígeno y un porcentaje de dióxido de carbono entre el 9 y el 13% (AneroGen™, Oxoid) a 30°C durante 5 días. En el caso del jamón y la cecina se hicieron siembras en placa TPGY agar previas a la incubación para

conocer con más exactitud el número de esporas de partida en cada dilución, no así en el chorizo, donde esta siembra resulta infructuosa por el crecimiento en las placas de TPGY de microbiota acompañante que imposibilita realizar algún tipo de recuento. Tras la incubación, a 1 ml de cada muestra se le aplicó la misma técnica de PCR descrita en el apartado continuo V.2.6.2. para la detección con los pares de cebadores específicos de *Clostridium sporogenes*, tabla V.VI. del apartado V.2.6.2. Una siembra posterior al enriquecimiento se demostró inútil porque su posible crecimiento sobre placa de TPGY agar queda totalmente enmascarado por un crecimiento desorbitado de la microbiota presente en el producto que aumenta con la incubación.

#### **V.2.6.2. Detección por PCR en los productos inoculados**

Al igual que en el capítulo II, el procedimiento seguido para el desarrollo de la técnica de PCR en la detección de *Clostridium sporogenes* ha sido agrupado en tres etapas en función del objetivo pretendido en cada una de ellas: preparación de la muestra, amplificación del material genético y detección de los amplicones generados.

Preparación de la muestra: de los caldos de enriquecimiento obtenidos según el protocolo recogido en el apartado V.2.5. para *Clostridium sporogenes* (enriquecimiento en medio TPGY durante 5 días en condiciones de anaerobiosis) se cogió 1 ml de cada muestra, depositándolo en eppendorfs de 1.5 ml (Eppendorf) para su posterior centrifugación (Eppendorf Centrifuge 5414 D) a 10000 G durante 5 minutos. Posteriormente, el sobrenadante fue cuidadosamente eliminado mediante suaves golpes sobre papel secante. Al pellet así obtenido se le añadieron 300 µl de agua con calidad PCR (agua ultrapura tipo I (Milli-Q Gradient, Millipore), esterilizada a 121°C durante 15 minutos (Selecta) y conservada bajo luz ultravioleta durante al menos 24 horas, para garantizar la ausencia de DNA contaminante) homogenizándolo bien con la misma y volviendo a centrifugarlo a 10000 G durante 5 minutos. Este proceso de lavado de la muestra se repitió otras dos veces con el fin de obtener un buen extracto libre, en lo posible, de sustancias que interfieran en la

amplificación. Tras el último lavado, y sin ser centrifugada, la muestra fue incubada a 100 °C durante 15 minutos en bloque térmico (Selecta) con el fin de liberar el ADN presente en la misma y posteriormente se centrifugó de nuevo a 10000G durante un minuto para eliminar las sustancias no deseadas quedando el ADN en el sobrenadante. De este sobrenadante se tomaron los 5 µl necesarios para el siguiente paso, siendo conservado el resto a congelación.

Amplificación del material genético: En esta etapa se procede a preparar la muestra de ADN obtenida en el paso anterior junto con los reactivos necesarios para llevar a cabo la amplificación de la misma. En un eppendorf de PCR (Eppendorf) de 0.5 ml se añadieron 10 µl de 2,5x MasterMix (5Prime) que es una mezcla que contiene la enzima *Taq* ADN polimerasa (62,5 U/ml), 125 mM KCl, ®-CA360 in 0,5%, 500 µM de cada dNTP, 75 mM Tris-HCl pH 8,3, 3,75 mM Mg(OAc)<sub>2</sub>, 0,25% Igepal u estabilizantes; 10 µl de una mezcla de 9 µl agua con calidad PCR y 0,5 µl de cada cebador (ver tabla V.VI.); y 5 µl de muestra.

Para el desarrollo de este experimento se usaron dos pares de cebadores distintos, de diferente procedencia bibliográfica (Pecoraro *et al.*, 1999; Le Bourhis *et al.*, 2005) que nos permitiesen valorar las posibles diferencias en la detección sobre el mismo microorganismo.

**Tabla V.VI. Cebadores utilizados en la técnica de PCR para la detección de *Clostridium sporogenes* en la muestras a estudio.**

Nombre	Secuencia (5'-3')	Fragmento amplificado	Referencia
Cspo V	5'-TGT AAA GCC CTG TTT TCT GGG-3'	572 bp del ARNr 16S	Pecoraro <i>et al.</i> , 1999
Psp R	5'-CAC CTA TCT CTA GGC TAT GCA A-3'		
P930	5'-GTG AAA TGC GTA ATT AGG AA-3'	665 bp del ARNr 16S	Le Bourhis <i>et al.</i> , 2005
P932	5'-GAT YYG CGA TTA CTA GYA ACT C-3'		

Paralelamente a la preparación de las muestras para el termociclado, se elaboraron muestras testigo necesarias para comprobar el buen desarrollo del mismo. Por un lado, se preparó una muestra blanco (10 µl de 2,5x MasterMix; 10 µl de una mezcla de 9 µl agua con calidad PCR y 0,5 µl de cada cebador o primer y 5 µl de agua de calidad PCR en eppendorf 0,5 µl) como modo de comprobar la ausencia de falsos positivos por contaminación de los materiales o reacciones cruzadas entre los cebadores. Por otro, se utilizó material genético extraído de cultivos puros de *Clostridium sporogenes* en iguales condiciones que las descritas para la preparación de la muestra y para la amplificación, con el fin de poder descartar la presencia de falsos negativos, es decir, que el resultado de la amplificación se interpretase como negativo estando el ADN muestra presente. Se usó para tal fin la cepa patrón nº 892, obtenida de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), lote 06-03-2008.

Los eppendorf con todas las muestras así preparadas fueron introducidos en un termociclador *Mastercycler* (Eppendorf) llevándose a cabo los siguientes programas de amplificación del material genético en función de los cebadores usados.

Para los cebadores Cspo V y Psp R (Pecoraro *et al.*, 1999) se usó este protocolo:

- 1 ciclo de 94°C durante 4 minutos para conseguir una buena separación de las hebras de ADN
- 30 ciclos de 3 etapas: desnaturalización a 94°C durante 20 segundos, hibridación a 58°C durante 30 segundos y elongación a 72°C durante 90 segundos
- 1 ciclo de incubación final a 72°C durante 5 minutos

Para los cebadores P930 y P932 (Le Bourhis *et al.*, 2005) se usó el siguiente protocolo (Le Bourhis *et al.*, 2007):

- 1 ciclo de 94°C durante 3 minutos, 64°C durante 90 segundos y 72°C durante 90 segundos

- 32 ciclos de 3 etapas: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 64°C durante 90 segundos y elongación a 72°C durante 90 segundos
- 1 ciclo de incubación final a 72°C durante 5 minutos

Detección de los amplicones generados: Debemos matizar que durante el discurso del desarrollo de los experimentos del presente capítulo fueron usados dos medios distintos de tinción de los amplicones: el bromuro de etidio y el GelRed.

Para ambos sistemas de detección, se cogieron 5 µl tanto de cada muestra, como del blanco y del control positivo, que unidos a 3 µl de una dilución que aporte densidad y color (ver tabla V.VII.), fueron sometidos a electroforesis consiguiendo una migración de los fragmentos de DNA a través de un gel de agarosa (0,5 mg de agarosa (Certified™ PCR Agarose, Bio-Rad) en 50 ml de solución tampón TBE (Conda)). También se cargó en uno de los pocillos el patrón del peso molecular de ADN de 1 kb (Biotools).

**Tabla V.VII. Composición, y utilidad de cada componente, de 10 ml de una dilución colorante con densidad para la carga de las muestras en el gel de electroforesis.**

Componentes	Cantidad	Utilidad del componente
Azul de bromofenol	25 µg	Dar color a la muestra para facilitar su carga en el pocillo y poder comprobar visualmente su correcta migración a través del gel de agarosa
Glicerol al 30%	3 ml	Confiere densidad a la muestra para poder ser depositada en el pocillo y no ser arrastrada por el buffer de carga
Agua miliQ	7 ml	Disolución de los demás componentes

La diferencia entre los dos sustancias de tinción utilizadas estriba en que para el revelado con bromuro de etidio al gel no se le añadió ningún otro reactivo, mientras que al gel de agarosa que se añadieron 5 µl de GelRed cuando este se utiliza como agente de revelado. Ambos tipos de gel han de ser sometidos a la acción de un campo eléctrico (Electrophoresis Power Suply,

Amersham Pharmacia Biotech) de 90 milivoltios durante 30 minutos para lograr la migración de los amplicones en función de su peso molecular.

Tras la migración se procedió al revelado del gel. Para el revelado con bromuro de etidio fue necesaria la inmersión del mismo en un baño de bromuro de etidio diluido al 1% durante 15 minutos. Tras este baño se expone el gel a luz ultravioleta de longitud de onda 312 nm en transiluminador (ETX F20.M, Vilber Lourmat) donde se aprecian como positivas las muestras que ofrecen bandas refringentes con el peso molecular esperado para los cebadores utilizados y como negativas las muestras que no producen bandas refringentes. Con el GelRed como agente de revelado el gel se deposita directamente sobre el transiluminador.

### V.3. Resultados

#### V.3.1. Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero

A las dos horas de la inoculación del producto y tras su envasado a vacío y conservación a 3°C y a 20°C se realizó un análisis microbiológico para valorar el comportamiento del inóculo y una detección precoz de posibles fallos. Se excluyó del análisis inicial las muestras envasadas en atmósferas modificadas por la reducida difusión y el escaso efecto de los gases sobre este producto en tan poco tiempo. Los resultados se presentan en la tabla V.VII.

**Tabla V.VIII. Resultados de los análisis microbiológicos a tiempo cero de los productos inoculados con *Clostridium sporogenes*.**

Tª conservación muestra		20°C	20°C	3°C	3°C
Producto	<b>CHORIZO</b>	*	*	*	*
	<b>JAMÓN</b>	3,17	3,17	2,69	2,69
	<b>CECINA 10<sup>2</sup></b>	2,39	1,69	2,54	2
	<b>CECINA 10<sup>5</sup></b>	3,90	4,25	3,98	4,03

\* la presencia de microbiota acompañante ha impedido el recuento en estas muestras.



### V.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos clásicos en los distintos tiempos de muestreo

Los resultados de los análisis microbiológicos clásicos realizados en cada punto de muestreo quedan reflejados en las tablas y gráficos recogidos a continuación.

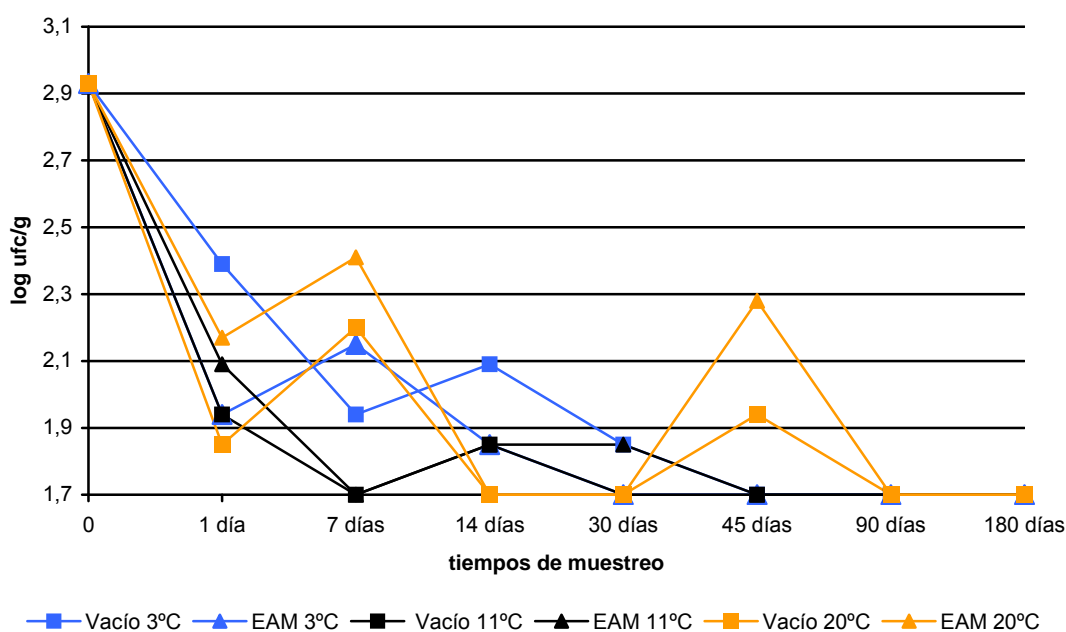
Los análisis microbiológicos realizados sobre las muestras de **chorizo** inoculadas resultaron infructuosos. Aunque fueron realizados en todos los puntos de muestreo, la presencia de la microbiota acompañante, seguramente bacterias ácido-lácticas, impidió los recuentos de *Clostridium sporogenes* en todos ellos, razón por la que no se incluye una tabla con resultados para este producto.

**Tabla V.IX. Resultados de la evolución de *Clostridium sporogenes* inoculado sobre jamón.**

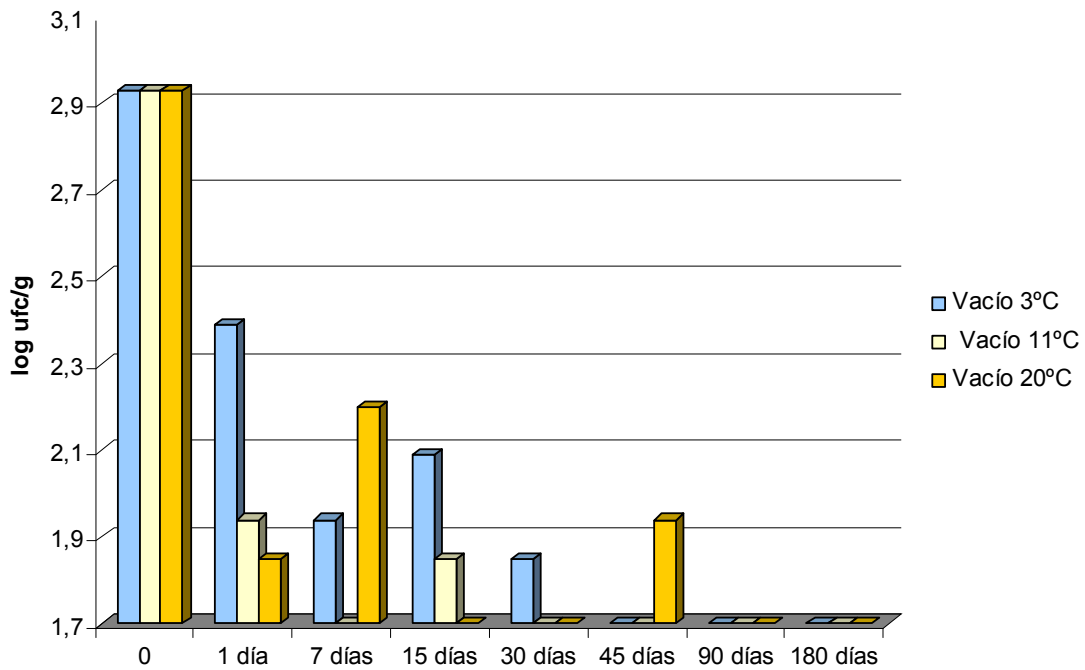
Jamón		<i>Clostridium sporogenes</i>						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	2,39	2,17	2,47	2,00	-	1,70	-
		2,39	-	1,70	-	-	-	-
	EAM	2,18	2,00	2,00	-	-	-	-
		1,70	2,30	1,70	-	-	-	-
11°C	Vacío	1,70	-	2,00	-	-	-	-
		2,18	-	-	-	-	-	-
	EAM	2,18	-	2,00	2,00	-	-	-
		2,00	-	-	-	-	-	-
20°C	Vacío	1,70	2,00	-	-	1,70	-	-
		2,00	2,39	-	-	2,18	-	-
	EAM	2,17	2,17	1,70	-	1,70	-	-
		2,17	2,65	-	-	2,85	-	-

EAM: Envasado en Atmósfera modificada. El dato numérico de cada punto de muestreo representa el logaritmo decimal del número de ufc/gramo presentes en la muestra (Unidades Formadoras de Colonias). "-": Por debajo del límite de detección de la técnica.

**Figura V.II. Evolución de *Clostridium sporogenes* en muestra de jamón**



**Figura V.III. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* en el chorizo envasado a vacío, a tres temperaturas de conservación.**



**Figura V.IV. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* en el chorizo envasado en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.**

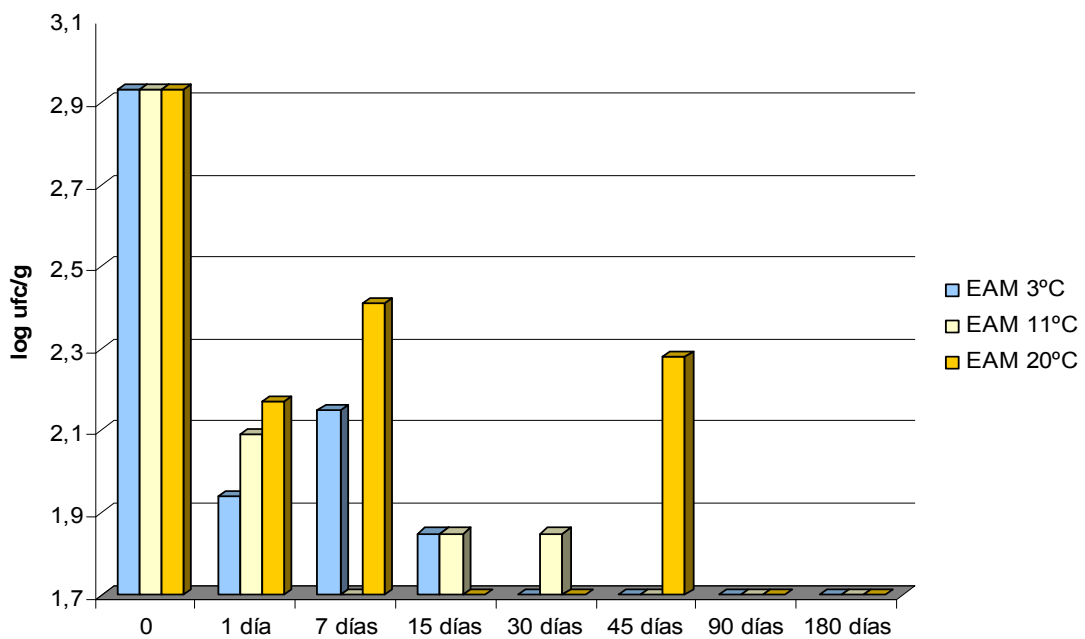
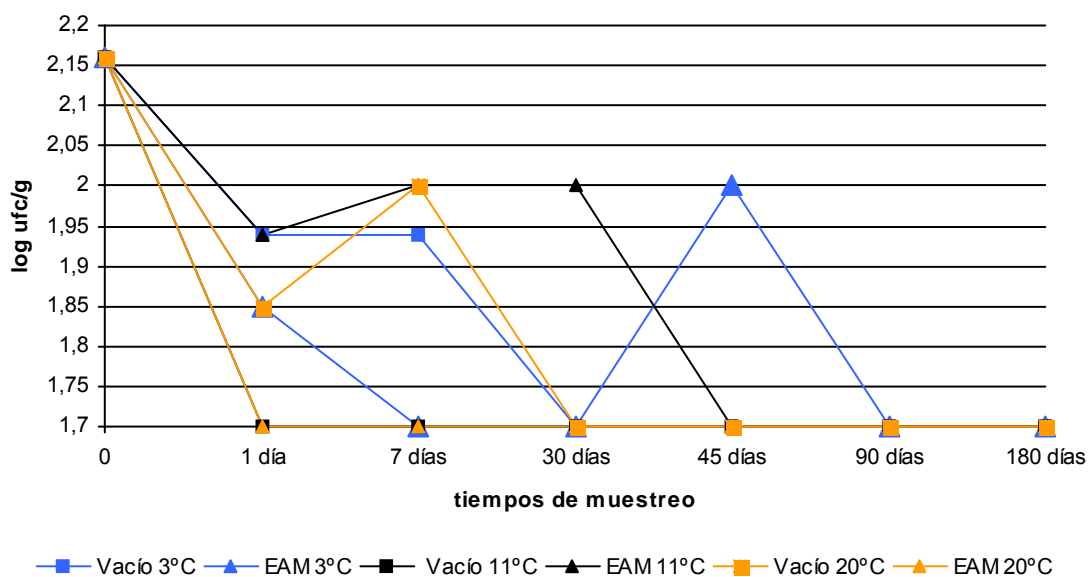


Tabla V.X. Resultados de la evolución de *Clostridium sporogenes* 10<sup>2</sup> ufc/g inoculado sobre cecina.

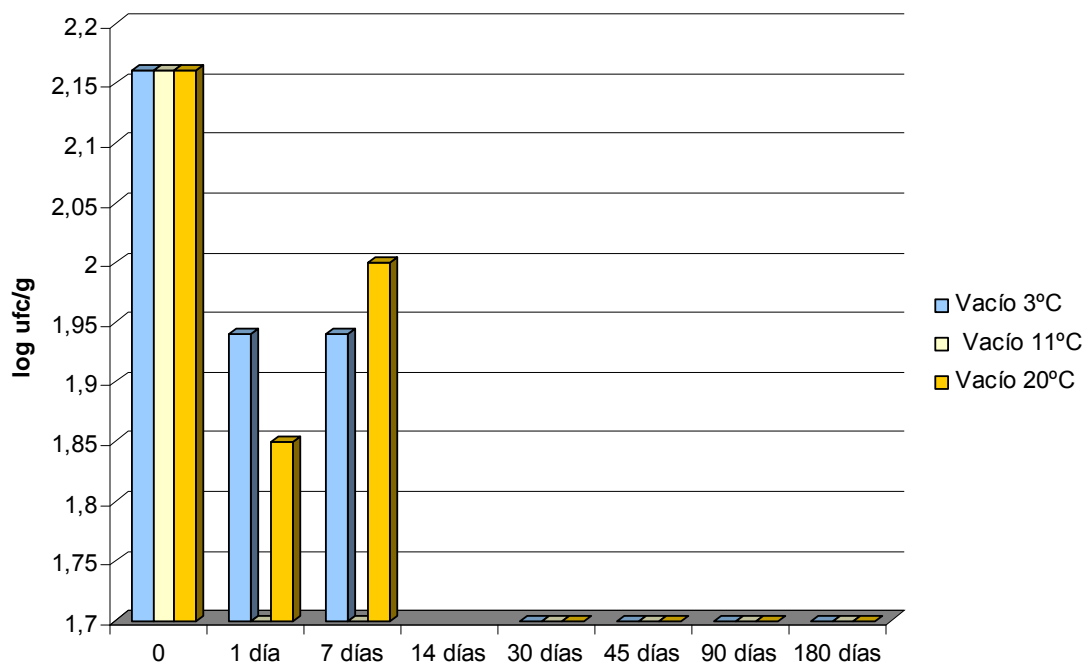
Cecina		<i>Clostridium sporogenes</i> inóculo 10 <sup>2</sup> esporas/g						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	-	-	*	-	-	-	-
	EAM	2,18	2,18	*	-	-	1,70	-
11°C	Vacío	-	-	*	-	-	-	-
	EAM	2,00	1,70	*	-	2,30	-	-
20°C	Vacío	2,00	2,30	*	-	-	-	-
	EAM	1,70	-	*	-	-	-	-

EAM: Envasado en Atmósfera modificada. El dato numérico de cada punto de muestreo representa el logaritmo decimal del número de ufc/gramo presentes en la muestra (Unidades Formadoras de Colonias). \* No hemos podido realizar el recuento por la presencia de flora contaminante, mohos, en las placas, lo que creemos que es debido a un mal cierre de la jarra de anaerobiosis. "-": por debajo del límite de detección de la técnica.

Figura V.V. Evolución de *Clostridium sporogenes* inóculo 10<sup>2</sup> esporas/g en muestra de cecina



**Figura V.VI. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* inoculado a  $10^2$  esporas/g en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.**



**Figura V.VII. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* inoculado a  $10^2$  esporas/g en la cecina envasada en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.**

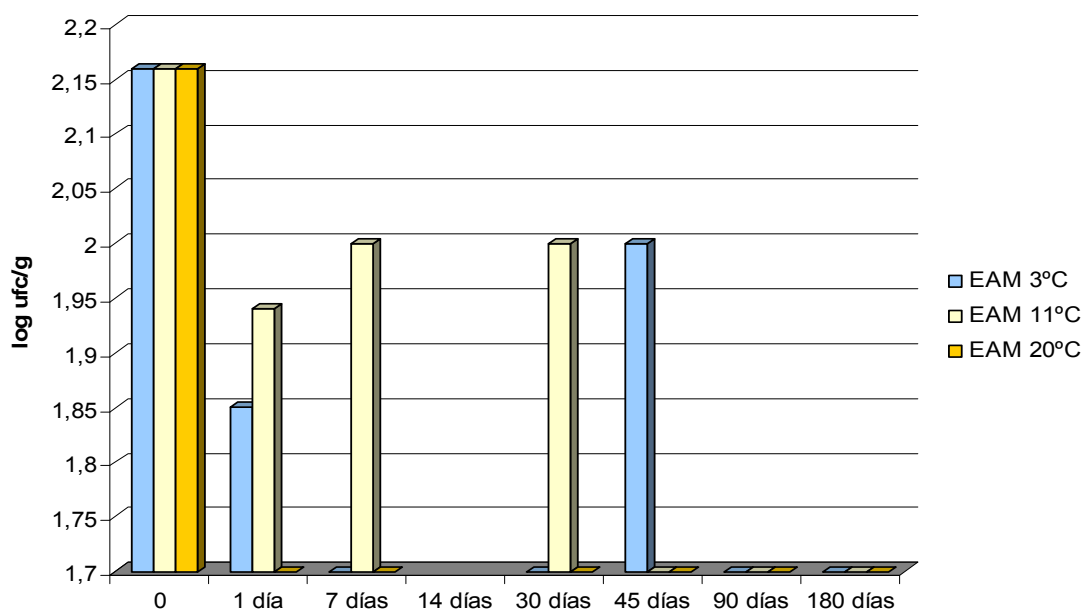
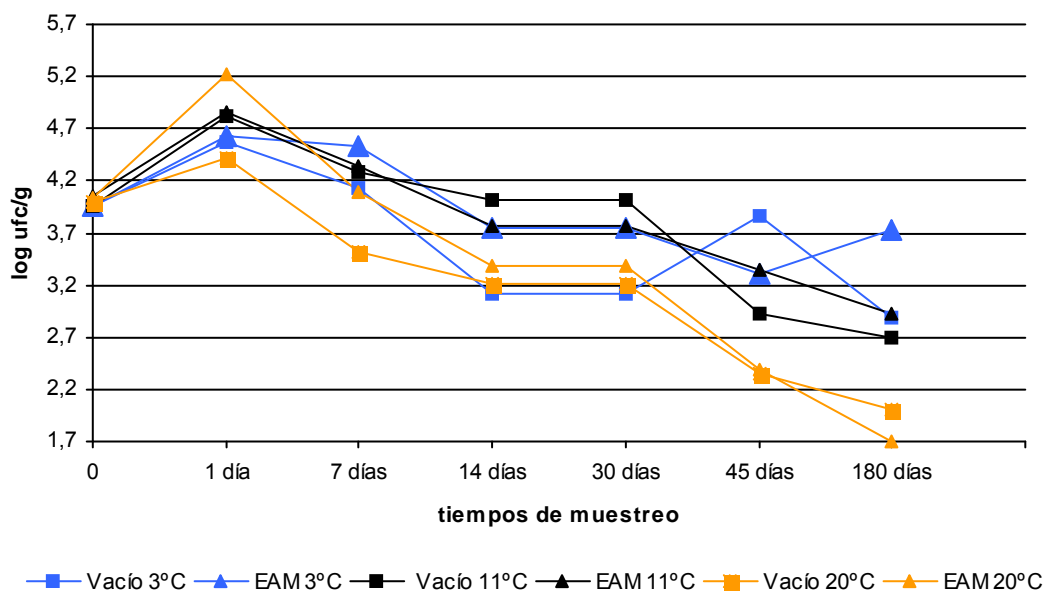


Tabla V.XI. Resultados de la evolución de *Clostridium sporogenes* 10<sup>5</sup> esporas/g inoculado sobre cecina.

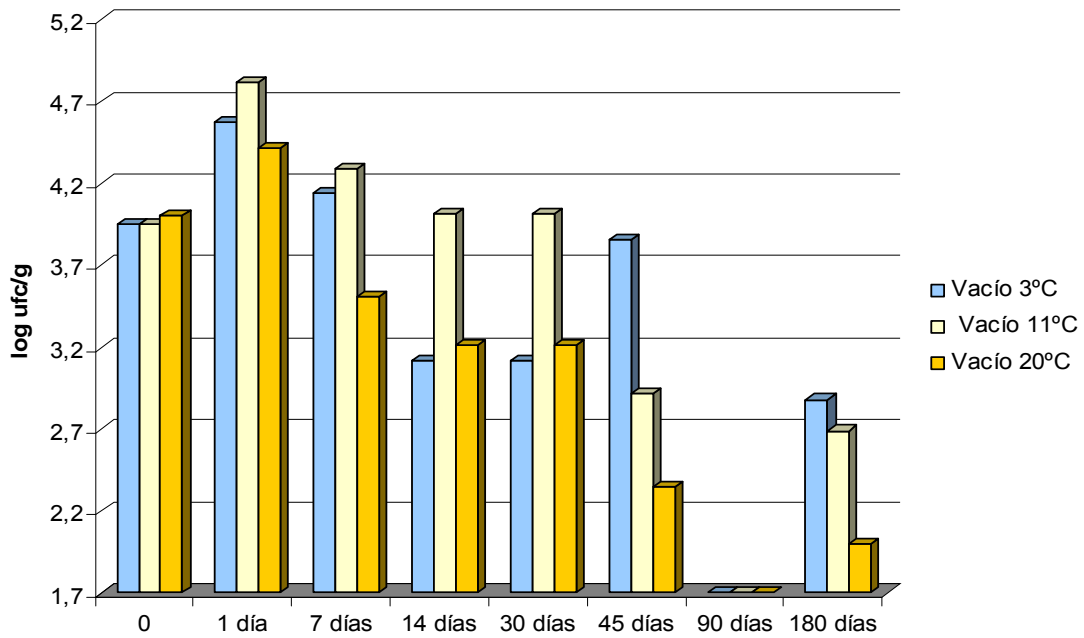
Cecina		<i>Clostridium sporogenes</i> inóculo 10 <sup>5</sup> ufc/g						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	4,48	3,61	2,94	3,43	3,92	-	3,11
		4,65	4,66	3,30	3,04	3,80	-	2,65
	EAM	4,65	4,64	3,77	3,66	3,29	-	3,73
		4,60	4,41	3,72	3,83	3,3	-	3,7
11°C	Vacío	4,83	4,25	4,24	2,89	3,06	-	2,60
		4,81	4,32	3,78	3,07	2,77	-	2,78
	EAM	4,90	4,41	3,76	3,18	3,37	-	2,93
		4,82	4,28	3,75	3,15	3,3	-	2,9
20°C	Vacío	4,50	2,96	3,32	2,44	1,96	-	2
		4,34	4,06	3,10	2,44	2,74	-	2
	EAM	5,45	4,23	3,37	2,80	2,36	-	1,7
		5	3,94	3,41	2,9	2,41	-	-

EAM: Envasado en Atmósfera modificada. El dato numérico de cada punto de muestreo representa el logaritmo decimal del número de ufc/gramo presentes en la muestra (Unidades Formadoras de Colonias). "-" Por debajo del límite de detección de la técnica.

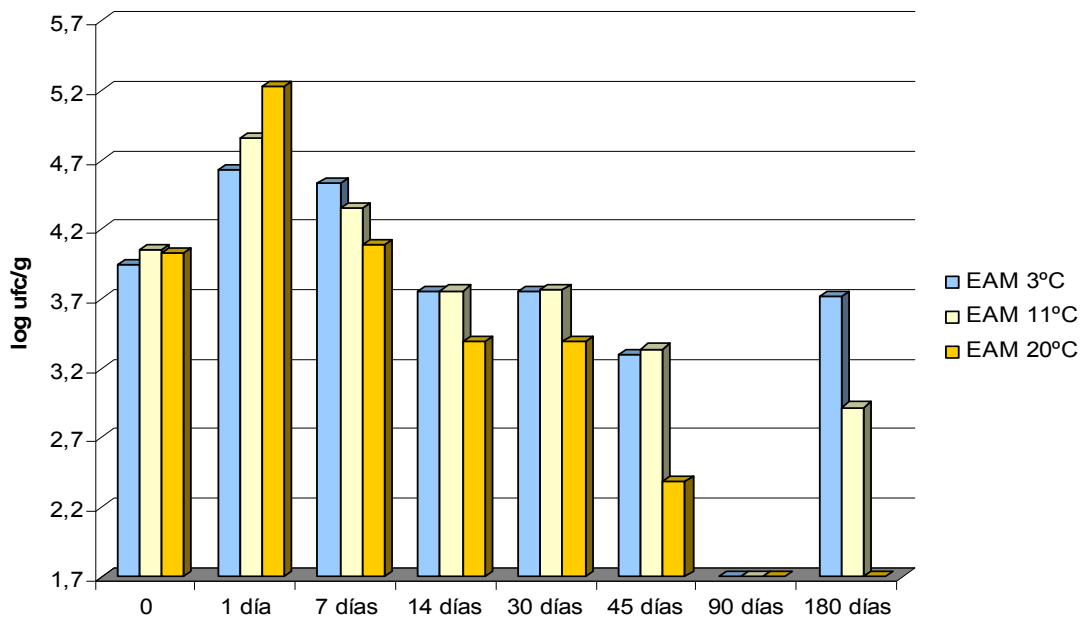
Figura V.VIII. Evolución de *Clostridium sporogenes* inóculo 10<sup>5</sup> esporas/g en muestra de cecina



**Figura V.IX. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* inoculado a  $10^5$  esporas/g en la cecina envasada a vacío, a tres temperaturas de conservación.**



**Figura V.X. Evolución a lo largo del experimental de los recuentos de *Clostridium sporogenes* inoculado a  $10^5$  esporas/g en la cecina envasada en atmósfera modificada, a tres temperaturas de conservación.**

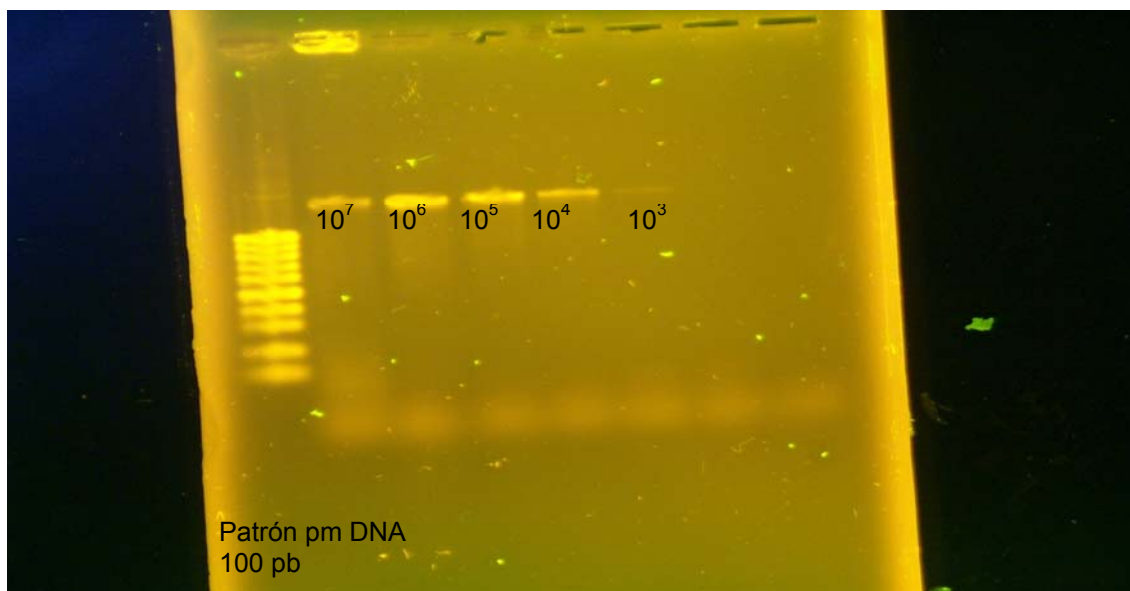


### V.3.3. Resultados de la técnica de PCR

#### V.3.3.1. Resultados del límite de detección de la técnica

Los resultados obtenidos en el cálculo del límite de detección de la técnica de PCR sobre una suspensión de células vegetativas de *Clostridium sporogenes* y sus correspondientes diluciones decimales en caldo TPGY, partiendo de concentraciones en torno a  $10^7$  ufc/ml, utilizando distintos pares de cebadores: los universales S1 y S2 (Lane, 1991), los específicos del Cluster I de *Clostridium*, P930/P932 (Le Bourhis *et al.*, 2005) y los específicos de *Clostridium sporogenes* Cspo V/Psp R (Pecoraro *et al.*, 1999) fueron muy similares, estando para los tres pares de cebadores siempre en torno a  $10^3$  ufc/ml. Una foto de los resultados obtenidos en estos experimentos queda recogida en la imagen V.XI.

**Figura V.XI. Revelado con bromuro de etidio de gel de azarosa con diluciones de la suspensión madre de *Clostridium sporogenes*.**



Gel de agarosa revelado en solución de bromuro de etidio donde se aprecian las bandas refringentes correspondientes al DNA amplificado de *Clostridium sporogenes*. Los números con exponente indican la dilución decimal a que corresponde cada banda. Como se puede apreciar, la dilución  $10^3$  ya ofrece una banda muy tenue.



Para la obtención de resultados en el cálculo del límite de detección de la técnica de PCR sobre células vegetativas de *Clostridium sporogenes* en un homogeneizado de caldo TPGY con las distintas matrices alimentarias a estudio: chorizo, jamón y cecina, se partió de una concentración conocida, o estimada en el caso del chorizo, de  $10^6$  células vegetativas de *Clostridium sporogenes* por cada ml de cada homogeneizado, y de la misma se hicieron diluciones decimales en los distintos homogeneizados. Para el análisis mediante PCR se utilizaron dos pares de cebadores: los específicos del Cluster I de *Clostridium*, P930/P932 (Le Bourhis *et al.*, 2005) y los específicos de *Clostridium sporogenes* Cspo V/Psp R (Pecoraro *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos para el jamón y la cecina fueron muy similares, estando para los dos pares de cebadores en torno a  $10^4$  y  $10^5$  ufc/ml, indicando que en alguna de las diversas repeticiones a concentraciones de  $10^4$  ufc/ml la banda de refringencia a veces es bastante tenue. En el caso del chorizo el límite se establece en  $10^6$  ufc/ml para los dos cebadores, lo que aumenta el LDT al trabajar sobre muestras de alimento.

Para el cálculo del límite de detección de la técnica sobre esporas de *Clostridium sporogenes* tras un enriquecimiento de 5 días a  $30^\circ\text{C}$  en caldo TPGY, se partió de una concentración conocida de esporos,  $10^5$  esporos/ml, de la cual se hicieron diluciones decimales sobre caldo TPGY. Tras la incubación durante 5 días a  $30^\circ\text{C}$  se realizó el análisis de los caldos mediante PCR utilizando dos pares de cebadores: los específicos del cluster I de *Clostridium*, P930/P932 (Le Bourhis *et al.*, 2005) y los específicos de *Clostridium sporogenes* Cspo V/Psp R (Pecoraro *et al.*, 1999). Por otro lado, se realizó una siembra en placa TPGY agar de las diluciones decimales de cada dilución de las esporas tras el enriquecimiento, observando que en todas ellas, hasta la dilución de 1 espora en 10 ml, tras el enriquecimiento presentan recuentos entre  $10^7$  y  $10^8$  de ufc/ml.

Los resultados obtenidos para los dos pares de cebadores indican que sobre caldo puro TPGY se pueden llegar a detectar, tras el enriquecimiento, **una espora en 10 ml.**

Para el cálculo del límite de detección de la técnica sobre esporas de *Clostridium sporogenes* inoculadas sobre el sobrenadante del homogeneizado de distintas matrices alimentarias y tras un enriquecimiento de 5 días a 30°C en caldo TPGY, partiendo de una concentración conocida de esporas,  $10^5$  esporas/ml, se hicieron diluciones decimales de la misma que fueron inoculadas sobre dicho sobrenadante de chorizo, jamón y cecina. Los caldos obtenidos tras la incubación de 5 días a 30°C fueron analizados mediante PCR utilizando dos pares de cebadores: los específicos del Cluster I de *Clostridium*, P930/P932 (Le Bourhis *et al.*, 2005) y los específicos de *Clostridium sporogenes* Cspo V/Psp R (Pecoraro *et al.*, 1999).

Los resultados obtenidos para el chorizo indican que podemos llegar a detectar la presencia de **1 espora** de *Clostridium sporogenes* **en 10 ml** del homogeneizado, y por extensión, de muestra.

Para el jamón y la cecina no se han obtenido resultados concluyentes, por lo que no podemos establecer el límite de detección sobre estos productos.

### V.3.3.2. Resultados de la detección de *Clostridium sporogenes* sobre los productos inoculados

Antes de la inoculación de los productos cárnicos se realizó sobre muestras de la misma técnica de PCR para descartar la presencia previa de *Clostridium sporogenes* u otros clostridios del cluster I que pudiesen ser detectados con los mismos cebadores, interfiriendo en los resultados de la investigación. Todos los resultados fueron negativos. Además se realizó una medición de pH del caldo tras la incubación con cada producto cárnico, resultando para todos ellos en torno a 6,8.

Los resultados obtenidos en la aplicación de la PCR sobre las muestras inoculadas a tiempo cero y en los distintos puntos de muestreo vienen recogidos en las tablas presentadas a continuación. En estas tablas, para facilitar la comparación de los resultados obtenidos entre los dos pares de cebadores usados, la información se señala así:

- la letra “P” en la casilla correspondiente indica que se obtuvo el mismo resultado con los dos pares de cebadores
- “-” indica que no detectó la presencia de *Clostridium sporogenes* tras el enriquecimiento de la muestra
- cuando aparece la letra “P\*” o “P\*\*” implica que se obtuvieron resultados distintos con los dos pares de cebadores, P\* indica que resultó negativo con los cebadores Le Bourhis *et al.*, 2005 y P\*\* que es negativo para los de Pecoraro *et al.*
- cuando el recuadro tiene fondo amarillo, esto indica que en el recuento por microbiología clásica se recontaron colonias consideradas como *Clostridium sporogenes* mientras que por la técnica de PCR no se pudo detectar el microorganismo con alguno de los pares de cebadores usados.

**Tabla V.XII. Resultados de la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de la muestras a tiempo cero.**

Microorganismo inoculado	<i>C. sporogenes</i>			
Tª conservación muestra	20°C	20°C	3°C	3°C
CHORIZO	P	P	P	P
JAMÓN	P	P	P	P
CECINA inóculo 10 <sup>2</sup> ufc/g	P	P	P	P
CECINA inóculo 10 <sup>5</sup> ufc/g	P	P	P	P

3°C: temperatura ambiente, 20°C: refrigeración, "P": Presencia de *C. sporogenes*

**Tabla V.XIII. Resultados para la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de las muestras de chorizo inoculadas.**

CHORIZO		<i>Clostridium sporogenes</i>						
Tª	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	P	-	-	-	-	-	-
		P	-	-	-	-	-	-
	EAM	P	-	-	-	-	-	-
		P	P	-	-	-	-	P**
11°C	Vacío	P**	-	-	-	-	-	P
		P	P**	-	-	-	-	P**
	EAM	P	-	-	-	-	-	P
		P	P**	P	-	-	-	-
20°C	Vacío	P	-	-	-	P	-	-
		P	P	-	-	-	-	-
	EAM	P	-	-	-	-	-	P**
		P	P**	-	-	-	-	P

"P" detección de *Clostridium sporogenes* en la muestra analizada tras 5 días de enriquecimiento a 30°C en caldo TPGY. "-" no detección de *Clostridium sporogenes* tras 5 días de enriquecimiento a 30°C en caldo TPGY. "P\* o P\*\*" se obtuvieron resultados distintos con los dos pares de cebadores usados, P\* negativo con los de Le Bourhis *et al.*, 2005 y P\*\* negativo con los de Pecoraro *et al.*, 1999.

**Tabla V.XIV. Resultados para la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de las muestras de jamón inoculadas.**

<b>JAMÓN</b>		<b><i>Clostridium sporogenes</i></b>						
<b>T<sup>a</sup></b>	<b>Sistema envasado</b>	<b>Tiempo de muestreo</b>						
		<b>1 día</b>	<b>7 días</b>	<b>15 días</b>	<b>30 días</b>	<b>45 días</b>	<b>90 días</b>	<b>180 días</b>
3°C	Vacío	<b>P**</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P*</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
		<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
	EAM	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	-	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
		<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	-	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
11°C	Vacío	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	-	<b>P**</b>
		<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P*</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
	EAM	<b>P**</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P*</b>	<b>P</b>
		<b>P</b>	-	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
20°C	Vacío	<b>P</b>	<b>P</b>	-	<b>P</b>	<b>P</b>	-	<b>P**</b>
		<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P**</b>	<b>P*</b>	<b>P**</b>
	EAM	<b>P*</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
		<b>P*</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>

“**P**” detección de *Clostridium sporogenes* en la muestra analizada tras 5 días de enriquecimiento a 30°C en caldo TPGY. “-” no detección de *Clostridium sporogenes* tras 5 días de enriquecimiento a 30°C en caldo TPGY. “**P\*** o **P\*\***” se obtuvieron resultados distintos con los dos pares de cebadores usados, **P\*** negativo con los de Le Bourhis *et al.*, 2005 y **P\*\*** negativo con los de Pecoraro *et al.*, 1999 “Recuadro amarillo” por microbiología clásica se obtuvieron recuentos y no así por PCR con alguno de los dos pares de cebadores usados.

Para las muestras analizadas a 180 días los resultados obtenidos, con ambos pares de cebadores, son muy tenues.

**Tabla V.XV. Resultados para la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de las muestras de cecina inoculadas con 10<sup>2</sup> ufc/g.**

CECINA		<i>Clostridium sporogenes</i> inóculo 10 <sup>2</sup> ufc/g						
T <sup>a</sup>	Sistema de envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	P	P	P	P	P	P*	P
		P	P	P	P	P	-	P
	EAM	P	P*	P	P	P	P	P
		P	P	P	P	P	P	P
11°C	Vacío	P	P	P	P	-	P*	P*
		P	P*	P	P	P	P*	P*
	EAM	P	P	P*	P	P	P	P*
		P	P*	P	P	P	P	P
20°C	Vacío	P	P	P	P*	-	P	P*
		P	P	P	P*	-	P*	P*
	EAM	P	P	P	P*	-	P*	P
		P	P*	P	P	-	P*	P*

“P” detección de *Clostridium sporogenes* en la muestra analizada tras 5 días de enriquecimiento a 30°C en caldo TPGY. “-” no detección de *Clostridium sporogenes* tras 5 días de enriquecimiento a 30°C en caldo TPGY. “P\* o P\*\*” se obtuvieron resultados distintos con los dos pares de cebadores usados, P\* negativo con los de Le Bourhis *et al.*, 2005 y P\*\* negativo con los de Pecoraro *et al.*, 1999 “Recuadro amarillo” por microbiología clásica se obtuvieron recuentos y no así por PCR con alguno de los dos pares de cebadores usados.

Sobre los resultados obtenidos en este experimento es considerado oportuno indicar una observación que se hizo sobre los mismos, y es que las bandas obtenidas para los dos pares de cebadores hasta el tiempo “30 días” eran claramente intensas al revelado con ultravioleta, mientras que las bandas obtenidas en tiempos posteriores ofrecían una imagen más tenue o menos refringente al revelado. Además, los resultados positivos obtenidos con los cebadores de Pecoraro *et al.*, 2005, en los tiempos “90 y 180 días” son muy tenues al revelado.

Tabla V.XVI. Resultados para la técnica de PCR tras un enriquecimiento de 5 días en caldo TPGY de las muestras de cecina inoculadas con  $10^5$  ufc/g.

CECINA		<i>Clostridium sporogenes</i> inóculo $10^5$ ufc/g						
T <sup>a</sup>	Sistema envasado	Tiempo de muestreo						
		1 día	7 días	15 días	30 días	45 días	90 días	180 días
3°C	Vacío	P	P	P	P	P*	-	P
		P*	P	P	-	P	P*	P
	EAM	P	P*	P	-	P	P	P
		P	P	P	P	P	P	P
11°C	Vacío	P*	P	P	-	P	P	P
		P*	P	P*	-	P	P	P
	EAM	P	P	P	P	P	P	P*
		P*	P*	P	P	P	P	P
20°C	Vacío	P*	P	P*	P	P	P	P*
		-	P	P*	P	P	P*	P
	EAM	P*	P	P	P	P	P	P
		-	P	P	P	P	P	P

“P” detección de *Clostridium sporogenes* en la muestra analizada tras 5 días de enriquecimiento a 30°C en caldo TPGY. “-” no detección de *Clostridium sporogenes* tras 5 días de enriquecimiento a 30°C en caldo TPGY. “P\* o P\*\*” se obtuvieron resultados distintos con los dos pares de cebadores usados, \* negativo con los de Le Bourhis *et al.*, 2005 y \*\* negativo con los de Pecoraro *et al.*, 1999 “Recuadro amarillo” por microbiología clásica se obtuvieron recuentos y no así por PCR con alguno de los dos pares de cebadores usados.

## V.5. Discusión

La evolución de las esporas de *Clostridium sporogenes* inoculadas en el **chorizo** antes de su envasado en vacío o en atmósfera modificada no ha podido ser valorada mediante las técnicas microbiológicas tradicionales. Como ya ha sido comentado en los resultados de este capítulo, la presencia de flora acompañante no permite el crecimiento o correcta manifestación de las colonias de *Clostridium sporogenes* en el medio sólido TPGY agar. Por lo tanto, en este producto ha resultado especialmente útil la aplicación de la técnica de PCR como sistema de detección.

En la tabla V.XIII. se recogen los resultados obtenidos en la aplicación de dos pares de cebadores, Le Bourhis *et al.*, 2005 y Pecoraro *et al.*, 1999, sobre el caldo de enriquecimiento TPGY de la muestra de chorizo tras 5 días de incubación a 30°C. En dicha tabla se puede observar que en el día 1 de muestreo todavía existen esporos viables que tras el enriquecimiento rinden la cantidad suficiente de ADN como para que puedan ser detectados por la técnica de PCR. En el día 7 de muestreo ya sólo son detectados en algunas de las muestras a todas las temperaturas de conservación, sin una especial influencia del envasado a vacío. A partir de este punto, prácticamente desaparecen, siendo sólo detectados en una muestra del día 15 de muestreo y en una del día 45 de muestreo.

Un aspecto especialmente peculiar es su sorprendente recuperación a los 180 días de la inoculación, donde algunas esporas son capaces de ser detectados en algunas muestras de todas las temperaturas. Esta curiosa recuperación al final de la vida útil del alimento, en este caso chorizo, está descrita en la literatura científica como “fenómeno Phoenix” (Jay, 1996; FDA, 2001). Este fenómeno se explica porque después de un largo periodo de latencia, en el que no es posible cultivar el inóculo, un pequeño número de células dañadas se recupera y puede crecer en el producto. Este fenómeno ha sido observado en una gran número de productos (Jay, 1996) y durante el desarrollo del experimental de los capítulos III, IV y V sólo ha sido observado en este producto. Por otro lado, también debería tenerse en cuenta otro factor, como es el cambio de la composición de la flora del chorizo tras un largo periodo de conservación, produciéndose un aumento de la flora proteolítica como las micrococáceas, disminuyendo las lácticas, que suele conducir a un aumento del pH del producto (Sanz, 2000), lo que favorecería el desarrollo de algunas esporas residuales de *Clostridium sporogenes*.

Por lo que respecta a la influencia de la temperatura sobre las esporas de *Clostridium sporogenes*, se puede observar un cierto efecto de control de las temperaturas de refrigeración sobre las mismas, dado que tras el día 1 de muestreo sólo se recupera el esporulado en una de las muestras conservadas



a refrigeración a 7 días y a 180 días, siendo más abundante en el resto de las muestras.

Por otro lado, no se puede afirmar, a la vista de los resultados, la existencia de diferencias significativas entre los efectos de las atmósferas de envasado del chorizo sobre este clostridio, aunque son más numerosas las muestras envasadas en atmósferas modificadas donde se detecta la presencia del microorganismo, tras el día 1 de muestreo, que sobre vacío (8 muestras frente a 4, tabla V.XIII.).

Para poder discutir la influencia de las características físico-químicas del chorizo que contribuyan al control de *Clostridium sporogenes*, vamos a considerar como factores limitantes del crecimiento de este microorganismo los mismos que para el *Clostridium botulinum* grupo I o proteolítico. Basamos esta decisión en que *Clostridium sporogenes* está científicamente aceptado como un homólogo del grupo I de *Clostridium botulinum*, mostrando una homología de la secuencia ARNr de hasta un 99,7% (Hutson *et al.*, 1993).

Por lo tanto, en lo que se refiere a las características físico-químicas del crecimiento de *Clostridium botulinum* grupo I, el pH inhibitor se encuentra en 4,6, la actividad de agua en 0,94 y la concentración inhibitora de sal en el 10% (Johnson, 2007). En nuestras muestras, el pH medio obtenido es de 4,99, superior al límite de crecimiento del patógeno, lo que no supondría un factor limitante del desarrollo del mismo. Respecto a la actividad de agua, 0,874, este parámetro sí que supondría un importante obstáculo en el desarrollo de los esporos inoculados, ya que impediría su desarrollo como célula vegetativa. Por último, el porcentaje de sal del chorizo, 2,34, es bastante inferior a ese amplio 10% que toleraría *Clostridium botulinum* tipo I.

Lo curioso de nuestros resultados es que las características del chorizo inhiben el crecimiento de la spora, o la destruyen, tras el día 1 de muestreo, en prácticamente la mayoría de las muestras incluso durante el enriquecimiento en el medio TPGY que ofrecería unas condiciones óptimas para el desarrollo del microorganismo. En este medio la actividad de agua, único factor limitante

según el párrafo anterior, ya no supondría un obstáculo. Una vez más, la explicación a esta inhibición debe estar en la flora propia de este producto o en las sustancias que esta flora libera al medio, los ácidos orgánicos y las bacteriocinas, o en el efecto competidor de la misma por los nutrientes, que inhibe claramente el crecimiento de *Clostridium sporogenes*. A este respecto, está publicado un estudio del posible efecto de cultivos protectores como *Lactococcus lactis* (microorganismo aislado como componente habitual de la flora autóctona del chorizo en España, Benito *et al.*, 2007) y *Pediococcus pentosaceus* en una co-incubación con *Clostridium botulinum* en caldo TPGY, en el que se demostró que a 10°C *Lactococcus lactis* inhibe el crecimiento de *C. botulinum* a los 6 días de incubación, sin embargo ese mismo efecto no se observa en la incubación a 15°C, donde se produce un aumento de la población de *Clostridium botulinum* inoculada (Rodgers *et al.*, 2004). En nuestro caso se incubó a 30°C, de lo que podría esperarse un aumento de la presencia de *C. sporogenes*, al tratarse de una matriz orgánica compleja con una microbiota también compleja que debe ejercer un efecto sinérgico sobre el control del patógeno.

Por otro lado, el pH del caldo TPGY tras el enriquecimiento con los productos cárnicos a estudio es de 6,8, lo que tampoco supone una acción inhibidora del desarrollo de las esporas.

Como ya ha sido comentado en la introducción de este capítulo, el chorizo presenta un largo historial de seguridad microbiológica frente a *Clostridium botulinum*. Investigaciones llevadas a cabo sobre el salami, producto que presenta diferencias respecto al chorizo pero que es un embutido cárnico, sobre el potencial crecimiento y producción de toxina de *Clostridium botulinum*, no han podido demostrar la producción de toxina cuando el proceso de elaboración es el adecuado (Kueper y Trelease, 1974; Christiasen *et al.*, 1975; Normal y Gudding, 1975; Lücke *et al.*, 1983;).

Por último, una observación respecto a los resultados de la técnica aplicada de PCR, es que pueden observarse algunas diferencias en cuanto a los resultados ofrecidos por los dos pares de cebadores. En este producto los

cebadores de Pecoraro *et al.*, 1999, parecen menos sensibles que los de Le Bourhis *et al.*, 2005, pues ofrecen un resultado negativo, ausencia de banda, en algunas de las muestras que sí muestran resultados positivos con los de Le Bourhis.

En el caso del **jamón**, sí se han obtenido resultados sobre el comportamiento de las esporas de *Clostridium sporogenes* inoculadas aplicando las técnicas microbiológicas convencionales, que quedan reflejados en la tabla V.IX. y la figura V.II. Como puede observarse, se produce una disminución de, aproximadamente, una unidad logarítmica en el número de esporas que se pueden recuperar, respecto a las inoculadas inicialmente, en el día 1 de muestreo en todas las muestras, independientemente del sistema de envasado o la temperatura de conservación. A los 7 días puede observarse un ligero aumento en algunos de los recuentos, respecto al punto de muestreo anterior y sin alcanzar la tasa de inoculación, especialmente en las muestras conservadas a 20°C, aumento que para el resto de temperaturas se retrasa hasta el día 15 de muestreo. Posteriormente, y en general, se produce una paulatina desaparición del microorganismo con una leve recuperación el día 45 en las muestras conservadas a 20°C.

A partir del día 90 de muestreo no se recupera en ninguna de las muestras, salvo el recuento de una colonia aislada en una muestra envasada a vacío y conservada a refrigeración.

Por lo que respecta a la influencia de la temperatura de conservación de las muestras sobre la supervivencia de los esporos, se puede observar que las muestras conservadas a 20°C, independientemente de la atmósfera, presentan un menor control sobre el microorganismo, dado que los recuentos se producen en todos los duplicados de estas muestras. Es la temperatura de conservación 11°C donde parece que se produce mayor control sobre el desarrollo de *C. sporogenes*.

Respecto a la influencia del sistema de envasado, no se puede afirmar que, con estos resultados, se observen diferencias significativas en cuanto al

comportamiento de *C. sporogenes* inoculado en el jamón. Este aspecto, especialmente la influencia del envasado a vacío como medio favorecedor del desarrollo de *Clostridium botulinum* ha sido, y es, motivo de alerta científica, especialmente después de los brotes sucedidos en pescado envasado a vacío (Kautter, 1964) que originaron investigaciones al respecto, como la desarrollada por Christiansen y Foster en 1965. En esta investigación, realizada sobre jamón bologna (cocido), el jamón loncheado era inoculado con esporos de *Clostridium botulinum* tipo A y envasado en plástico transparente con y sin vacío. En sus resultados no detectaron ninguna diferencia en cuanto a la velocidad de síntesis de la toxina entre ambos sistemas de envasado, lo que les condujo a afirmar que el envasado en vacío tiene muy poco efecto, o ninguno, sobre la capacidad de *Clostridium botulinum* para crecer en carnes curadas. Aún existiendo experimentos antiguos, como este que acabamos de citar, el envasado a vacío se sigue viendo como una posible causa del incremento del riesgo de botulismo en productos cárnicos curados (Johnson, 2007). Por otro lado, al tratarse de un microorganismo anaerobio como ya fue mencionado en la introducción de este capítulo, todavía no han sido documentados brotes relacionados con productos cárnicos envasados.

En relación a las características físico-químicas que controlan la supervivencia y el desarrollo de las esporas en este producto utilizaremos los mismos datos, basándonos en el mismo argumento de la discusión sobre el chorizo, publicados para *Clostridium botulinum* grupo I (Rodger *et al.*, 2004). Por lo tanto, el pH medio del jamón, 5,60-5,88, se encuentra muy por encima, en términos de pH, del 4,6 que supone el límite de actividad para este microorganismo. En relación a la actividad de agua, 0,883-0,892, este parámetro, al igual que en el chorizo, sí supondría un obstáculo para el desarrollo de la spora sobre el producto, dado que el valor considerado como límite es 0,94. En cuanto al porcentaje de sal, 3,44-4,02%, este es bastante inferior al 10% considerado como limitante para el desarrollo del microorganismo. Los resultados de los análisis microbiológicos tradicionales parecen indicar que, tras un periodo de 15 días, en la mayoría de las muestras las esporas inoculadas desaparecen o no logran desarrollarse en la forma vegetativa tras la siembra en placa TPGY, lo que podría indicar el daño o la

inhibición que las propiedades físico-químicas del jamón y, en especial, su actividad de agua, puedan haber infringido sobre el microorganismo.

En la bibliografía sobre la presencia o el desarrollo de *Clostridium botulinum* en jamones son bastante abundantes las referencias a los brotes de intoxicación causados por el curado casero de este tipo de producto (Hauschild, 1993; Roblot *et al.*, 1994; Neghina *et al.*, 2010), cuya causa parece estar en el retraso de la penetración de la sal en la pieza, lo que permite el crecimiento y la toxicogénesis de la esporas de *C. botulinum* presentes en la profundidad de la pieza (Lücke *et al.*, 1982). Por lo tanto, el porcentaje de sal y la actividad de agua han demostrado juegan un papel importante en la inhibición de este patógeno. En un experimento llevado a cabo sobre el efecto de la actividad de agua, el pH y la temperatura sobre el inicio del crecimiento vegetativo de las esporas se observó que estos factores actúan de una manera sinérgica, aumentando los mínimos a los cuales se puede desarrollar la espora. Por otro lado, también se observó que la actividad de agua mínima requerida para que se inicie la fase vegetativa es mayor en presencia de sal (Baird-Parker y Freame, 1967). Esta afirmación sigue vigente, siendo un hecho actualmente aceptado que es la combinación de los factores inhibidores de los productos cárnicos curados, especialmente en jamones y pancetas, concentración de sal, actividad de agua y la presencia de nitratos y nitritos, la que contribuye especialmente a la inhibición de *Clostridium botulinum* (Bell y Kyriakides, 2005).

Por último, en los resultados recogidos en la tabla V.IX. sobre la aplicación de la técnica de PCR al caldo de enriquecimiento de las muestras de jamón envasadas, se puede observar que prácticamente en todas las muestras se han podido recuperar las esporas inoculadas hasta el punto de rendir la cantidad suficiente de ADN como para que puedan ser detectadas por esta técnica. Esto indicaría dos cosas: que algunos esporos de *C. sporogenes* sobreviven hasta el final de la vida útil del producto con la capacidad suficiente como para desarrollarse en un caldo de cultivo óptimo y en las condiciones de tiempo y temperatura adecuadas, y que en este caso, a diferencia del chorizo, la flora o las sustancias propias del jamón no ejercen una acción inhibidora lo

suficientemente fuerte como para anular el efecto positivo sobre el desarrollo de las esporas del caldo TPGY en condiciones óptimas. Por otro lado, aunque en esta tabla pueden observarse diferencias en cuanto a los resultados de los dos pares de cebadores utilizados, no siempre coinciden con una menor sensibilidad de los de Pecoraro respecto a los de Le Bourhis, como sucedía en el chorizo. Algunas de las muestras ofrecen resultados negativos obtenidos con la aplicación de los cebadores de Le Bourhis que luego resultan positivos con la aplicación de los de Pecoraro, y viceversa. Otro aspecto que se puede observar en los resultados recogidos en dicha tabla es el rendimiento de falsos negativos por parte de la técnica de PCR respecto a la técnica microbiológica convencional, pues en algunas de las muestras donde se obtuvieron recuentos en placa uno de los dos pares de cebadores distintos utilizados ofrecen resultados negativos, con ausencia de banda tras el revelado (recuadros amarillos de la tabla V.IX.).

Respecto al comportamiento de *C. sporogenes* inoculado en la **cecina**, en este producto se han llevado a cabo dos experimentos en los que difiere la concentración del inóculo inicial. En uno de ellos, al que llamaremos **A**, se parte de una concentración inicial de  $10^2$  ufc/g de *Clostridium sporogenes*, y en otro, al que llamaremos **B**, se intentaba partir de una concentración de  $10^5$  ufc/g del mismo microorganismo, para comprobar si la concentración inicial del inóculo tiene influencia sobre el comportamiento de las esporas en la cecina, producto implicado en un brote de botulismo que dio origen, en parte, a este trabajo de investigación.

Los resultados de la aplicación de la técnica microbiológica convencional sobre las muestras inoculadas con una baja dosis inicial de *C. sporogenes* quedan recogidos en la tabla V.X. En ella se puede observar que el microorganismo apenas se recupera ya el día 1 tras la inoculación, manteniéndose en cantidades parecidas tras en el día 7 de muestreo, con un ligero aumento para alguna de las muestras conservadas a 11°C y 20°C, al igual que sucede en el jamón. El día 15 no ofrece resultados por contaminación con mohos de las placas inoculadas, por lo tanto el siguiente punto de muestreo útil es el día 30, donde desaparece de todas las muestras excepto de

una de las envasadas en atmósfera modificada y conservadas a 11°C. Esta desaparición del microorganismo de las muestras se mantiene hasta el final de la vida útil del mismo, salvo por dos excepciones, con bajos recuentos, a 45 y 90 días. A 180 días no se recupera de ninguna de las muestras.

Los resultados de la aplicación de la técnica microbiológica convencional sobre las muestras inoculadas con una alta dosis inicial de *C. sporogenes* quedan recogidos en la tabla V.XI. En este caso, tras la inoculación se produce un ligero aumento el día 1 de muestreo respecto a la tasa inicial de microorganismo. A partir de este punto se produce una disminución gradual de los recuentos, constante en todos los puntos de muestreo, excepto entre los días 15 y 30, donde se obtienen, sorprendentemente, casi las mismas medias en ambos. La ausencia de recuentos en el día 90 de muestreo se debe, casi con toda certeza, a un error de procedimiento. En la figura V.XIII. se ha obviado este punto y con ello puede observarse que se mantiene la disminución constante y gradual de los recuentos, salvo ligera excepción de las muestras conservadas a 3°C y envasadas en atmósfera modificada.

Sobre la influencia de la temperatura de conservación de las muestras en la supervivencia de las esporas en el experimento A, en las figuras V.IX. e V.X. no se observan diferencias significativas, o pautas constantes, dada la pronta desaparición del microorganismo en los muestreos realizados. En el experimento B, sin embargo, las muestras conservadas a 20°C suelen ofrecer recuentos ligeramente inferiores respecto a las otras temperaturas de conservación, como puede ser observado en dichas figuras.

Respecto a la influencia del sistema de envasado en el experimento A no se observaron diferencias significativas. En el experimento B (ver figuras V.IX. e V.X.) puede observarse la misma disminución gradual de los recuentos en ambos sistemas. Sin embargo, en estos gráficos si puede inferirse una ligera interrelación entre la temperatura de conservación a 11°C y el envasado a vacío, dado que los recuentos obtenidos en estas condiciones, entre los días 1 y 30 de muestreo, son algo superiores a los demás, diferencia siempre inferior a una unidad logarítmica.

En relación a las características físico-químicas de la cecina que afectan a la supervivencia y desarrollo de *Clostridium sporogenes*, al igual que en productos anteriores, utilizaremos los datos publicados para *Clostridium botulinum* grupo I sobre los límites de su desarrollo. En el caso de la cecina, el pH medio de este producto, 5,73 es lo bastante elevado, en términos de pH, como para no suponer un obstáculo en el desarrollo de las esporas. Respecto a la actividad de agua, 0,889, este valor está muy por debajo del 0,940 que limita el crecimiento de los esporos, por lo tanto este parámetro, al igual que en los otros productos, sí que supone un claro impedimento para el desarrollo de los esporos. El porcentaje medio de sal, 4,05%, tampoco es un factor limitante del desarrollo de este microorganismo, que tolera porcentajes de sal relativamente elevados.

Comparando los resultados obtenidos para los dos niveles de inóculo se puede observar que partiendo de una tasa alta se produce un ligero aumento inicial en los recuentos en el día 1 de muestreo, efecto que no se observa con el inóculo bajo. Por lo demás, con una baja dosis de inoculación el microorganismo no puede ser recuperado a los pocos días del comienzo del experimento, mientras que con una dosis elevada se mantiene hasta el final del mismo, hasta los 180 días, manifestando una disminución paulatina y gradual del mismo. En ensayos sobre *Clostridium botulinum* diversos autores también han trabajado con dos dosis de inóculo sobre el mismo producto en las mismas condiciones, obteniendo como resultado que la variación de los niveles de inóculo tenía un efecto notable sobre el tiempo de formación de la toxina (Meng y Genigerogis, 1993), disminuyendo éste con dosis de inóculo mayores. Otra investigación demostró claramente el efecto de distintas concentraciones de esporas sobre el potencial de crecimiento y de formación de toxina, siendo unos niveles de  $10^4$  ufc/g de esporos los que más probablemente resultan en jamones tóxicos (Pivnick y Bird, 1965). Estos mismos autores demostraron que el crecimiento y la toxicogénesis no se veían afectados por los distintos tipos de atmósferas de envasado, pudiendo producirse la toxina a la misma rapidez en envases permeables al oxígeno como en envasados en anaerobiosis.



Por último, respecto al comportamiento de los dos pares de cebadores utilizados en este experimental sobre *C. sporogenes*, hemos de resaltar el hecho de que en todas las muestras donde se han producido resultados distintos para uno y otro par, los resultados negativos se deben a los cebadores de Le Bourhis *et al.*, 2005, pareciendo que la sensibilidad de dicho par es menor respecto a los de Pecoraro *et al.*, 1999. Por otro lado, es sorprendente la abundancia de falsos negativos en la aplicación de la técnica de PCR sobre las muestras del experimento B, es decir, la ausencia de banda en muestras donde si se obtienen recuentos por la técnica microbiológica convencional. En el caso de las muestras valoradas el día 1 después de la inoculación puede deberse a un exceso de material genético que produce un agotamiento de los reactivos en las primeras etapas de la reacción, no rindiendo los amplicones suficientes como para ser detectados en el revelado. Para el resto de falsos negativos no tenemos una explicación plausible.

Por lo tanto, a modo de conclusión general, podemos afirmar que el chorizo ejerce un control de las esporas de *Clostridium sporogenes* más inmediato que el jamón y la cecina, presentando estos dos últimos productos un comportamiento similar. Por otro lado no se han observado diferencias significativas de la influencia de las temperaturas de conservación o de las atmósferas de envasado sobre el control del clostridio. Por último, una dosis elevada de inóculo inicial de *C. sporogenes* permite la supervivencia del microorganismo sobre la cecina durante un periodo mayor de tiempo, en este caso hasta el final de la vida útil de la misma.

## **CAPÍTULO VI**

**Evaluación de la supervivencia  
de esporas de *Clostridium sporogenes*,  
como apatógeno de *Clostridium botulinum*,  
durante el proceso de elaboración  
de cecina de vacuno**



## I.1. Introducción

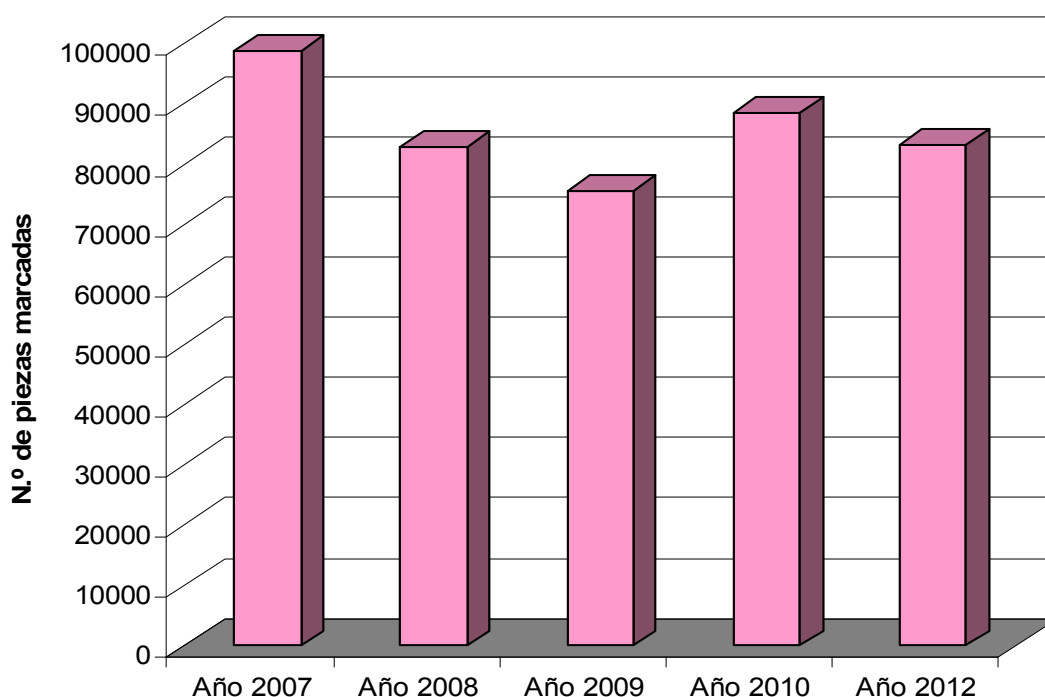
La cecina de vacuno es un producto cárnico de especial relevancia en la provincia de León donde, tradicional y exclusivamente, se elaboran las cecinas así denominadas y acogidas a la Indicación Geográfica Protegida (IGP), vigente desde 1994, “Cecina de León” (BOCyL, 1994; BOE, 1994; DOCE, 1996). Las cecinas producidas bajo el amparo de esta IGP están consideradas como una salazón cárnica ahumada y curada de alguna de las siguientes piezas anatómicas: tapa, contra, babilla o cadera, de un vacuno mayor con un mínimo de cinco años.

Se trata de un producto tradicional cuya antigua elaboración ya aparece recogida en varios documentos a lo largo de la historia, como en “De Re Rústica” de Lucio Junio Moderato *Comunela*, aproximadamente por el año 42 d. de C., o en el “Tratado de Agricultura General” de Gabriel Alonso de Herrera del año 1513, apareciendo citada también en novelas populares como vianda de agrado en “El Ingenioso Hidalgo Don Quijote de la Mancha”, “La Pícara Justina” o “Fray Gerundio Campazas”.

El aporte de la cecina a la economía de esta provincia ha sido, y es, bastante importante, apareciendo ya recogido en documentos antiguos como el Diccionario de Madoz, publicado entre 1845 y 1850, en cuyas estadísticas se informa de que la cantidad de cecina consumida por habitante en un año era de 972 arrobas (unos 11,5 kg) y que se vendía, por aquella época, a 6,20 reales el kilo.

Su notable aporte a la economía regional actual se puede comprobar en los datos que nos aportó el Consejo Regulador de la IGP “Cecina de León”, cuyos informes recogen la tendencia variable de la producción, que en el año 2011 supusieron aproximadamente 83.351 piezas producidas. La evolución de la producción se puede observar en la figura VI.I. (datos no publicados de Consejo Regulador de la Cecina de León, 2012).

**Figura VI.I. Evolución de la producción de Cecina de León.**



Fuente: IGP Cecina de León, 2012.

Desde los inicios de la creación de la IGP en 1994, Zumalacárregui *et al.*, 2001, ya observaron que las exportaciones a la Unión Europea habían aumentado desde un 3 % al 7,8 % en un corto periodo de tiempo. Actualmente, y siempre de acuerdo con los datos aportados por el Consejo Regulador, aunque la mayoría de las piezas marcadas en 2008 fueron destinadas al mercado nacional, un porcentaje elevado de las mismas se exportó a países de la Unión Europea y terceros, representando este sector un importante mercado. Por otro lado, un amplio y potencial mercado internacional lo constituyen los países árabes, ya que se ha tomado la decisión de producir cecina con certificación Halal, cuya aceptación supondría una importante fuente de ingresos y de desarrollo para la economía regional.

De todo lo expuesto anteriormente se puede afirmar que la elaboración de cecina de vacuno en la provincia de León, además de aportar valor cultural como parte del patrimonio alimentario de esta región, también contribuye

notablemente al desarrollo de su economía, generando puestos de trabajo y asentando la población en la producción primaria en torno a la misma.

El interés que supone la cecina de León como fuente de ingresos para la provincia fue uno de los impulsores de la creación y desarrollo de la IGP “*Cecina de León*” en 1994 (BOE, 1994), acogida al control de un Consejo Regulador cuyo objetivo es garantizar la calidad de la cecina elaborada en la provincia de León.

El ámbito de actuación de este consejo regulador y de sus normativas abarca, bajo el Reglamento ratificado a tal fin (BOE, 1994), cuestiones variadas que van desde la zona de elaboración, *exclusivamente la provincia de León*; la materia prima, *carne procedente preferentemente de razas autóctonas de la Comunidad Autónoma de Castilla y León, proveniente del despiece de los cuartos traseros de ganado vacuno mayor con un mínimo de 5 años de edad y un peso mínimo de 400 kg*; o las características finales de la cecina: *distintas tonalidades de color desde cereza a granate, con ligero veteado, poco salado y de consistencia fibrosa*.

Otro de los aspectos regulados por el Reglamento de la IGP, y motivo de interés para la presente Tesis doctoral por las posibles repercusiones sobre la calidad microbiológica final del producto, es el proceso de elaboración de la cecina. Éste está claramente definido y delimitado en dicho Reglamento en las siguientes seis etapas:

- Perfilado: permite ajustar la forma de las piezas.
- Salado: tiene por finalidad la incorporación de sal común a la masa muscular, favoreciendo la deshidratación de las piezas y su perfecta conservación, además de contribuir al desarrollo del color y aroma típicos de los productos curados. A este fin, las piezas se cubren con sal marina de grano grueso, apiladas según los sistemas tradicionales. El tiempo de salazón ha de tener una duración de 0,3 días y 0,6 días por kg de peso, y el proceso de salado deberá tener lugar a una temperatura entre 2 °C y 5 °C, y una humedad relativa entre el 80% y el 90%.

- Lavado: transcurrida la fase de salado, se lavan las piezas con agua potable, templada o tibia, con objeto de eliminar la sal adherida en la superficie.
- Asentamiento: etapa cuya duración oscila entre 30 y 45 días. Esta fase tiene por finalidad eliminar el agua de constitución, hacer penetrar la sal de una manera homogénea y uniforme, favorecer el desarrollo de la microflora característica y canalizar los procesos bioquímicos de hidrólisis enzimática que producirán el aroma y sabor característicos. Al eliminarse lenta y paulatinamente el agua superficial, las piezas adquieren una mayor consistencia.
- Ahumado: las piezas se ahuman utilizando leña de roble o encina. La duración de esta fase esta comprendida entre 12 y 16 días.
- Secado o curación: en esta fase se procede a la clasificación de las piezas según peso y conformación. Esta fase se realiza en secaderos naturales, que permitan controlar tanto la temperatura como la humedad mediante el sistema tradicional de “abrir y cerrar ventanas”. En estos locales o en bodegas permanecerán las cecinas hasta completar su maduración.

Todo este proceso tendrá una duración mínima de siete meses contados a partir de la entrada en salazón (artículo 11 del Capítulo II del Reglamento de la IGP Cecina de León).

Dado que la seguridad de un producto es uno de los parámetros esenciales de la calidad, la *imagen de calidad*, uno de los objetivos de la IGP de Cecina de León, se vio afectada por un brote de botulismo registrado en 2005 asociado a una pieza de cecina elaborada en la región y no incluida en la IGP Cecina de León (AESAN, 2005).

Por todo ello, teniendo en cuenta la demanda actual de productos de calidad y seguros, las consecuencias perjudiciales que tienen sobre la economía los brotes asociados a productos determinados y el hecho de que todavía existen pocos estudios sobre la Cecina de León, el desarrollo experimental propuesto para este capítulo persigue el **objetivo** de

complementar el capítulo V y evaluar el comportamiento y supervivencia durante las distintas etapas del proceso de elaboración de una pieza de cecina de los esporos de *Clostridium sporogenes*, como *surrogate microorganism* de *Clostridium botulinum*, tras ser inoculados sobre la materia prima cruda.

## **VI.2. Material y métodos**

### **VI.2.1. Planificación del trabajo experimental**

Para el desarrollo de este capítulo se inocularon esporos de *Clostridium sporogenes*, como apatógeno de *Clostridium botulinum*, sobre cinco piezas de babilla, las cuales se dividieron en dos grupos, uno sometido a ahumado y otro no, para valorar el posible efecto control del ahumado sobre los esporos, quedando una de ellas como reserva en caso de deterioro de las otras a estudio y como fuente de las muestras utilizadas en la medición de la actividad de agua y las concentraciones de sal, nitratos y nitritos. La pieza de reserva no fue ahumada.

Cada pieza cruda de babilla fue inoculada, en sectores delimitados a tal fin, con dos concentraciones distintas de esporas de *Clostridium sporogenes*, siguiendo el criterio descrito en el apartado VI.2.5.

Posteriormente, las piezas así inoculadas fueron procesadas siguiendo el proceso de elaboración recogido en las directrices del Reglamento de la IGP “Cecina de León” (BOE, 1994), respetando los tiempos, temperaturas y humedades relativas recogidos en tabla VI.I. En cada etapa del mismo fueron llevados a cabo análisis físico-químicos y microbiológicos de las muestras obtenidas de cada pieza. Al igual que en los experimentos anteriores, también se realizó un análisis a tiempo cero, correspondiente a las dos horas de inoculación de las muestras, para comprobar el correcto desarrollo del procedimiento.



**Tabla VI.I. Diagrama de flujo de la elaboración de la cecina, condiciones respetadas en cada etapa y muestreos realizados.**

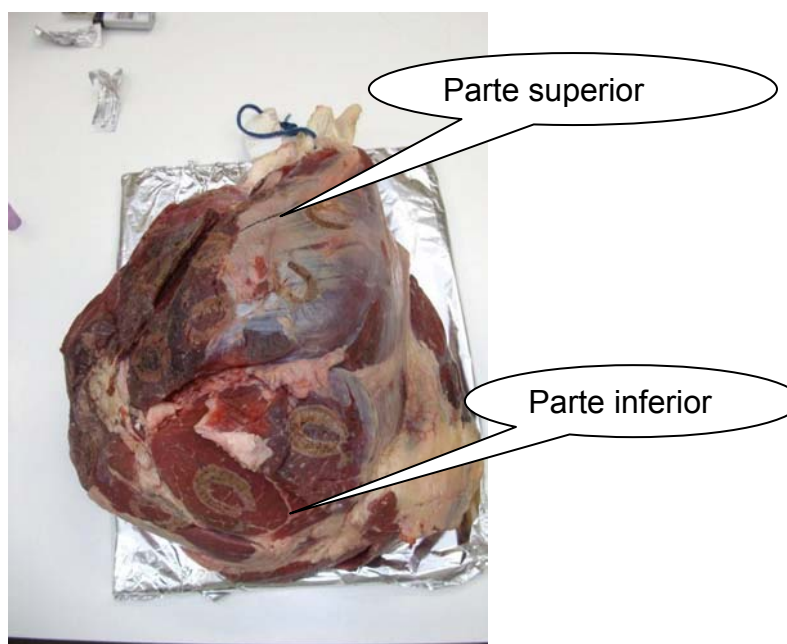
Etapa de la elaboración	Condiciones	Puntos de muestreo
Perfilado		$t_0$ tras inoculación
↓		
Salado	2,5 días, 1°C, 85% HR	
↓		
Lavado		$t_1$ después del lavado
↓		
Asentamiento	40 días, 7°C, 78% HR	$t_2$ día 20 de asentamiento $t_3$ al final del asentamiento
↓		
Ahumado	14 días, 12°C, 80% HR	$t_4$ al final del ahumado
↓		
Secado	5 meses, de 7 → 12°C, 75% HR	$t_5$ a mitad de secado $t_6$ al final del secado

### VI.2.2. Descripción de las muestras

Para la elaboración de la cecina de vacuno en este experimento la babilla fue la pieza anatómica de elección.

La babilla es una *pieza cárnica de forma ovoidal integrada por los componentes del m. cuadrado del muslo (m. recto del muslo y vaso lateral, intermedio y medial)* (BOE, 1994). La forma aproximada de esta pieza se puede observar en la figura VI.III., resultado de interés las indicaciones que se hacen en la misma para la posterior comprensión del método utilizado en la medida del pH.

**Figura VI.III. Pieza de cecina de babilla, cara anterior.**



En el desarrollo de esta investigación fueron utilizadas cinco babillas, de vacunos mayores de cinco años, con pesos mayores de 7 kg, siguiendo las especificaciones del Reglamento del Consejo Regulador (BOCyL, 1994), suministradas por la empresa ALCARMI, C/ Triana, 14. 24249. Pobladura de Pelayo García, León. N.º RGSA 10.16793/LE.

Las babillas, tras su recepción en las instalaciones del ICTAL, fueron conservados un día a refrigeración, a menos de 4 °C, hasta su inoculación.

Los otros ingredientes necesarios que también fueron usados para la correcta elaboración de la cecina son:

- Sal marina refinada seca alimenticia, de la empresa DISAL, con esta composición: sal, antiaglomerante E-535 máximo 10 g/kg
- Preparado *Pakers jam*, de la empresa CEYLAN, S.L. compuesta de: sal, azúcar, Nitrato potásico e-252 (4.5%), Nitrito potásico E-250 (1,8 %), ácido ascórbico E-300.

### **VI. 2.3. Análisis físico-químico**

El primer paso antes de las inoculaciones fue la medición del pH de cada babilla mediante la punción con pH-metro Crisol, molelo 506, previamente calibrado, provisto de un electrodo de punción cuya punta era lavada y secada en cada medición. La medida se realizó sobre cuatro puntos, dos en la parte superior de la pieza y dos en la inferior, siendo indicado el pH de cada pieza como la media de todas las lecturas.

Posteriormente, en cada punto de muestreo se realizaron análisis físico-químicos de la babilla de reserva en proceso de transformación a cecina, midiendo en cada punto los siguientes parámetros: actividad de agua, pH y porcentaje de cloruro sódico.

Dichos análisis se realizaron mediante métodos destructivos de muestreo, siguiendo los mismos protocolos detallados para los análisis físico-químicos recogidos en el apartado I.2.2. de la presente Tesis, a excepción del pH para el que se siguió el método indicado en el primer párrafo de este apartado.

### **VI.2.4. Análisis microbiológico previo**

A las babillas sobre los que se llevaron a cabo las inoculaciones se les realizó una evaluación previa de su calidad microbiológica mediante análisis microbiológicos análogos a los descritos en los apartados I.2.3. y II.2.3. de esta Tesis.

### **VI.2.5. Cepa y preparación del inóculo**

Al igual que en el capítulo V de la esta Tesis, la cepa de *Clostridium sporogenes* utilizada en este estudio como inóculo pertenece a la colección de la CECT, en concreto se trabajó con la cepa nº 892, lote 06-03-2008.

Dicha cepa se mantenía conservada a -30°C en crioviales con una mezcla de 0,5 ml de glicerol (Panreac) y 0,5 ml de caldo de cultivo TSB (Tryptone Soya Broth, Oxoid).

También en este caso *C. sporogenes* fue inoculado en forma de esporos (también denominados endosporas, formas vegetativas de resistencia de algunos microorganismos procariotas), siguiendo las pautas marcadas en trabajos anteriores tomados como referencia (Baker y Genigeorgis, 1990; Dodds, 1993b; Meng y Genigeorgis, 1993).

Para el proceso de obtención de los esporos se utilizaron los procedimientos descritos en el apartado V.2.3. de la presente Tesis.

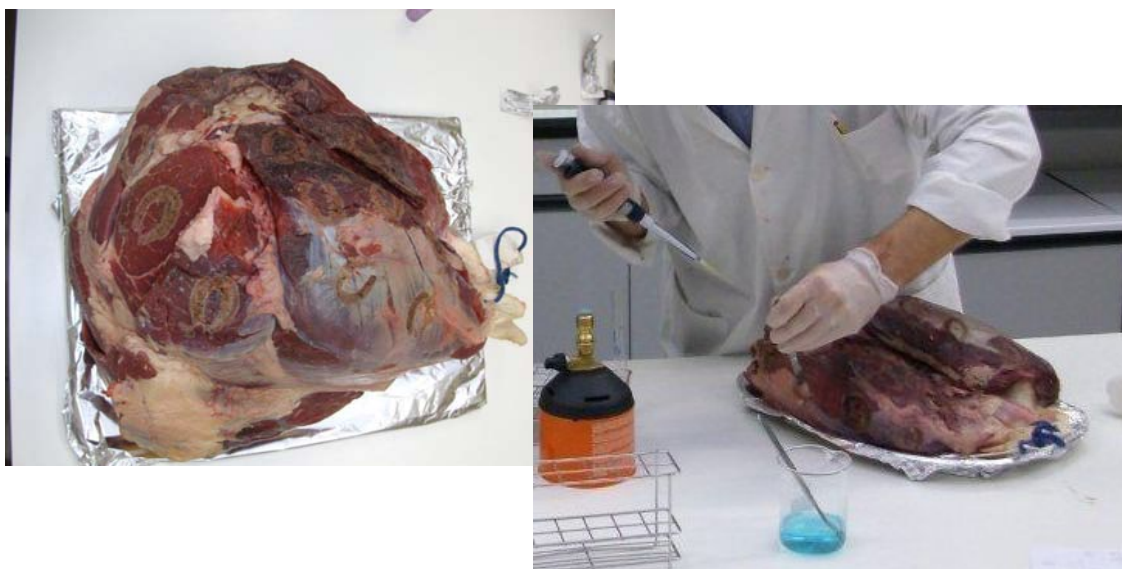
#### **VI.2.6. Preparación, inoculación y condiciones de almacenamiento de las piezas cárnicas**

Para la preparación y elaboración de las cecinas a partir de piezas de babilla se siguieron en todo momento las pautas establecidas por el Consejo Regulador de la IGP “Cecina de León”, especialmente las referidas a las operaciones de elaboración recogidas en el artículo 10 de la Orden del 27 de junio de 1994 que ratifica el Reglamento de la Denominación Específica “Cecina de León”, BOE n.º165 del martes 12 de julio de 1994.

El primer paso del proceso experimental consistió en el perfilado, con cuchillo, y sangrado, mediante la presión manual, de cada babilla, para ajustar la forma de las piezas cárnicas y eliminar restos de sangre que facilitarían la alteración durante el curso de la elaboración.

Posteriormente se llevó a cabo la inoculación de las babillas mediante el depósito de 50 µl de distintas concentraciones de esporos en un pequeño corte realizado en condiciones de esterilidad en una zona previamente delimitada con una marca a fuego (figura VI.IV.).

**Figura VI.IV. Inoculación de las babillas.**



En el lado izquierdo de la cara anterior de cada babilla fueron inoculados 50  $\mu$ l de la dilución  $10^{-4}$  de una suspensión de esporos de concentración conocida,  $2,40 \cdot 10^7$  ufc/ml, esperando conseguir una concentración de  $10^2$  ufc/g en el punto de inoculación (Baker y Genigeorgis, 1990; Dodds, 1993b; Hyytiä *et al.*, 1997; Hyytiä *et al.*, 1999). En el lado derecho de la cara anterior de cada babilla se inocularon 50  $\mu$ l de la primera dilución de la misma suspensión, esperando conseguir una concentración de  $10^5$  ufc/g en el punto de inoculación (Meng y Genigeorgis, 1993; Bell y Kyriakides, 2005).

Antes del salado se llevó a cabo el análisis a tiempo cero para comprobar el correcto desarrollo de la inoculación.

Posteriormente se procedió al salado de las piezas mediante frotamiento con una mezcla 1/1 de sal marina y un preparado “Parkers jam” que contiene los conservantes habituales usados en este tipo de producto (ver VI.2.2.).

Una vez realizado este paso las piezas de cecina fueron conservadas, totalmente cubiertas exclusivamente con sal marina, durante 2,5 días en una cámara a 1 °C con una humedad relativa del 85 %.

A la salida del salado se procedió al lavado de las piezas cárnicas con agua potable fría en adecuadas condiciones higiénicas, tras lo cual cada una de las piezas fue introducida individualmente en una red, sobre la que volvió a delimitar con rotulador indeleble los puntos de inoculación. En este momento se llevó a cabo el primer muestreo,  $t_1$ , analizando dos puntos de inoculación en cada babilla, uno de cada concentración.

Las piezas así lavadas fueron llevadas a la cámara de asentamiento en las instalaciones del ICTAL donde se mantuvieron, colgadas en posición vertical por la parte superior de la pieza de cecina, por un periodo de 40 días a 7 °C con una humedad relativa del 78 %. En un punto intermedio del asentamiento, 20 días, y al final del mismo se llevaron a cabo los muestreos  $t_2$  y  $t_3$ .

Al acabar el período de asentamiento las babillas n.º 1 y n.º 3 fueron ahumadas gracias a la colaboración de una industria elaboradora de productos cárnicos de la región. Se mantuvieron, convenientemente aisladas, en la sala de ahumado de dicha industria durante 14 días en las condiciones estándar usadas por el fabricante, 12 °C y un 80 % de humedad relativa. Las otras tres se mantuvieron en la misma cámara de asentamiento en iguales condiciones. Al cabo de estos 14 días se llevó a cabo el muestreo  $t_4$ .

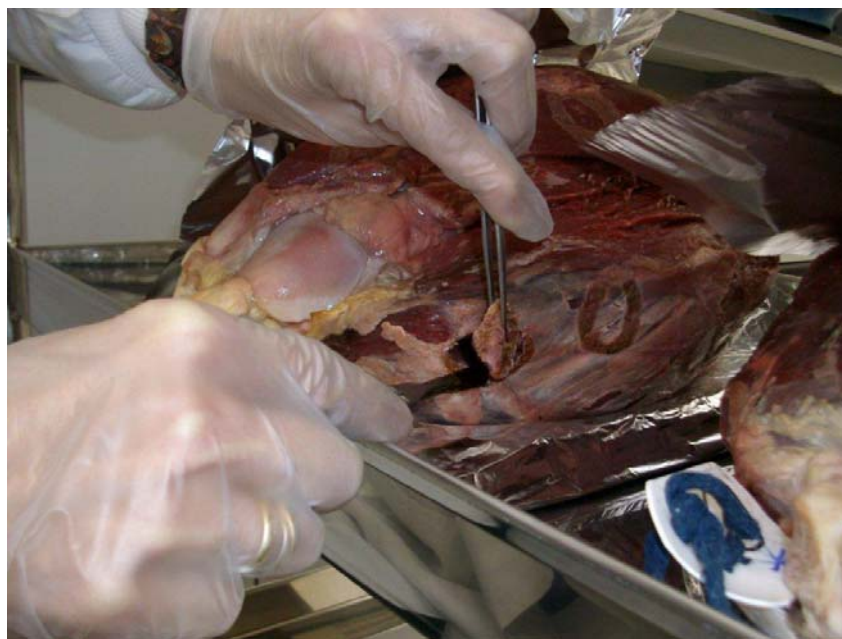
Tras esta etapa se fueron cambiando paulatinamente las condiciones de la cámara de asentamiento hasta ajustarla a una temperatura de 12 °C y una humedad relativa del 75 %, consiguiendo así el secado o maduración de las piezas. En un punto intermedio de esta etapa, dos meses y medio, y al final de la misma se llevaron a cabo los muestreos  $t_5$  y  $t_6$ .

### **VI.2.7. Análisis físico-químico y microbiológico de las muestras inoculadas**

Como ya fue indicado en el punto VI.2.3. en cada tiempo de muestreo se realizaron los análisis físico-químicos descritos en ese apartado sobre la pieza utilizada como reserva, la babilla n.º 2.

Por otro lado, en cada tiempo de muestreo se analizaron dos muestras, una de cada concentración de esporos, por cada babilla mediante la obtención, en condiciones de esterilidad, de una cantidad aproximada a 10 g en el punto marcado para la inoculación (ver figura VI.V.).

**Figura VI.V. Obtención de las muestras.**



Tras el pesado de dicha muestra se calculó el volumen necesario de caldo TPGY necesario para obtener una dilución proporcionada, que fue añadido con probeta estéril.

Tras este paso el procedimiento seguido es el mismo que el recogido en el apartado V.2.5.

## VI.2.8. Identificación por PCR

En este capítulo además de las técnicas microbiológicas convencionales para la detección de microorganismos, también se aplicó la PCR como método de identificación de *Clostridium sporogenes*, siguiendo las mismas pautas establecidas en el apartado V.2.6.2. de la presente Tesis para los primers de Le Bourhis *et al.*, 2005, sobre la materia prima y sobre colonias aisladas de las muestras sembradas sobre placa TPGY.

## VI.3. Resultados

### VI.3.1. Resultados de los análisis físico-químicos

Los resultados de los análisis físico-químicos vienen agrupados en función de parámetro en las siguientes tablas y gráficos.

**Tabla VI.II. Resultados de la medición del pH durante la elaboración de las cecinas.**

Babilla		MP	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>4</sub>	t <sub>5</sub>	t <sub>6</sub>
B1	Ahumadas	5,63	5,60	5,33	5,38	5,48	5,31	5,73	6,84
B3		5,55	5,53	5,23	5,35	5,42	5,41	5,97	5,71
B4	Sin ahumar	5,43	5,45	5,36	5,31	5,55	5,48	5,75	5,79
B5		5,42	5,45	5,33	5,07	5,44	5,51	6,43	5,82
B2		5,57	5,58	5,48	5,40	5,55	5,50	5,88	5,96

Babillas B1,2,3,4,5: Numeración asignada a cada pieza; B2: babilla reserva; t<sub>0,1,2,3,4,5,6</sub>: tiempos de muestreo (ver tabla VI.I.); MP: Materia prima, las babillas en los análisis previos.



Figura VI.VI. Evolución del pH durante la elaboración de la cecinas.

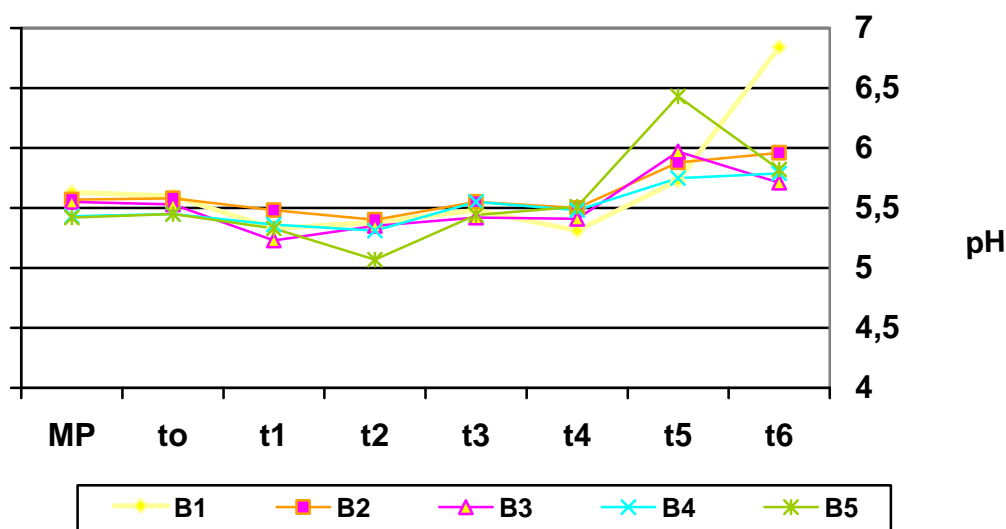


Tabla VI.III. Resultados de la medición de la actividad de agua sobre la cecina B2 (cecina reserva) durante la elaboración.

	t <sub>1</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>4</sub>	t <sub>5</sub>	t <sub>6</sub>
<b>a<sub>w</sub></b>	0,947	0,966	0,957	0,961	0,942	0,930

t<sub>0,1,2,3,4,5,6</sub>: tiempos de muestreo (ver tabla VI.I.). a<sub>w</sub>: actividad de agua

Tabla VI.IV. Resultados de la medición de la actividad de agua en el t<sub>6</sub> para todas las cecinas.

	B1	B2	B3	B4	B5
<b>a<sub>w</sub></b>	0,899	0,930	0,902	0,906	0,854

El porcentaje medio final de sal de la cecina n.º 2, tomada como referencia de las demás cecinas, fue **3,74 %**. El porcentaje de sal en los puntos intermedios de muestreo se desconoce debido al deterioro accidental de las muestras durante el proceso de extracción. La presencia de nitratos y nitritos no fue detectada en esta pieza.

### VI.3.2. Resultados de los análisis microbiológicos previos

Sobre las babillas, utilizadas como materia prima, antes de su inoculación se realizaron análisis microbiológicos previos para conocer la calidad higiénica de los productos. Los resultados obtenidos quedan presentados en la tabla VI.V.

**Tabla VI.V. Resultados de los análisis microbiológicos previos realizados sobre las babillas utilizadas como materia prima.**

	Babilla 1	Babilla 2	Babilla 3	Babilla 4	Babilla 5
<b>MAMV</b>	7,69	8,08	7,95	7,95	8,06
<b>ENT</b>	>	>	>	>	>
<b>COLI</b>	3,49	>	3,26	3,68	2,54
<b><i>E. coli</i></b>	-	3,79	-	-	-
<b>EA</b>	>	>	>	>	>
<b>EANA</b>	-	-	-	-	-
<b>STAPH</b>	-	-	-	-	-
<b>LIST</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>
<b>SAL</b>	A	A	<b>P</b>	A	A
<b>BOT</b>	A	A	A	A	A

MAMV: Microbiota Aerobia Mesófila Viable, ENT: Enterobacterias, COLI: Coliformes totales, E.coli: *Escherichia coli*, EA: Esporulados Aerobios, EANA: Esporulados Anaerobios, STAPH: *Staphylococcus aureus*, LIST: *Listeria monocytogenes*, SAL: *Salmonella* spp., BOT: *Clostridium botulinum*. P: presencia, A: ausencia, >: no se pudo realizar el recuento por la elevada contaminación de la placa, "-": por debajo del límite de detección de la técnica.

### VI.3.3. Resultados de los análisis microbiológicos en los distintos puntos de muestreo

Los resultados de los análisis microbiológicos quedan agrupados en la tabla VI.VI. y representados gráficamente en las figuras VI.VII. y VI.VIII.

Un aspecto a resaltar es que durante la evolución del periodo de maduración la morfología característica de las colonias de *Clostridium sporogenes* sufrió algunos cambios, haciéndose las colonias más pequeñas y

con menos vellosidades. Ante la duda de una posible mutación o el recuento erróneo de colonias que no fuesen *Clostridium sporogenes*, para confirmar la identificación de las mismas se aplicó la técnica de PCR directamente sobre las colonias aisladas. Aunque en la tabla VI.VI. se anotan los resultados obtenidos en los recuentos de colonias sospechosas de, por morfología similar, ser *Clostridium sporogenes*, sólo aquellos remarcados con sombreado de color amarillo resultaron positivos tras la realización de la PCR.

**Tabla VI.VI Resultados de la detección de *Clostridium sporogenes* durante la elaboración de las cecinas mediante cultivo en medio TPGY.**

	MP	t <sub>0</sub>	t <sub>1</sub>	t <sub>3</sub>	t <sub>2</sub>	t <sub>4</sub>	t <sub>5</sub>	t <sub>6</sub>	
B1	10 <sup>2</sup>	A	2,17	-	1,7	-	-	-	1,7
	10 <sup>5</sup>	A	4,13	4,31	3,23	3,25	2,60	-	-
B3	10 <sup>2</sup>	A	1,7	1,69	1,7	-	-	-	2,30
	10 <sup>5</sup>	A	4,06	3,74	-	-	-	-	1,7
B4	10 <sup>2</sup>	A	2,81	2,30	-	-	-	1,7	-
	10 <sup>5</sup>	A	4,27	3,65	-	2,85	-	2,30	-
B5	10 <sup>2</sup>	A	1,7	2	1,7	-	-	-	-
	10 <sup>5</sup>	A	4,28	4,27	2,90	2,30	-	2	2,69

Babillas B1,B2, B3, B4: piezas de cecina; 10<sup>2</sup> y 10<sup>5</sup>: cantidad de inóculo en número de ufc de *Clostridium sporogenes*; MP: materia prima, las babillas a la recepción antes de la inoculación; t<sub>0,1,2,3,4,5,6</sub>: tiempos de muestreo (ver tabla VI.VI.); A: ausencia de *C. sporogenes* en la materia prima tras la aplicación de la técnica de PCR con los cebadores de Le Bourhis *et al.*, 2005 Espacio en blanco: por debajo del límite de detección de la técnica; "sombreado amarillo": se recontaron colonias con morfología parecida a *Clostridium sporogenes* sobre las que al aplicar la técnica de PCR con los cebadores de Le Bourhis *et al.*, 2005, se obtuvo confirmación; "sombreado gris": colonias sospechosas que tras la aplicación de la técnica de PCR con los cebadores de Le Bourhis *et al.*, 2005, resultaron negativas como *C. sporogenes*.

Figura VI.VII. Evolución de las inoculaciones de  $10^2$  ufc de *Clostridium sporogenes* durante el proceso de elaboración de la cecina.

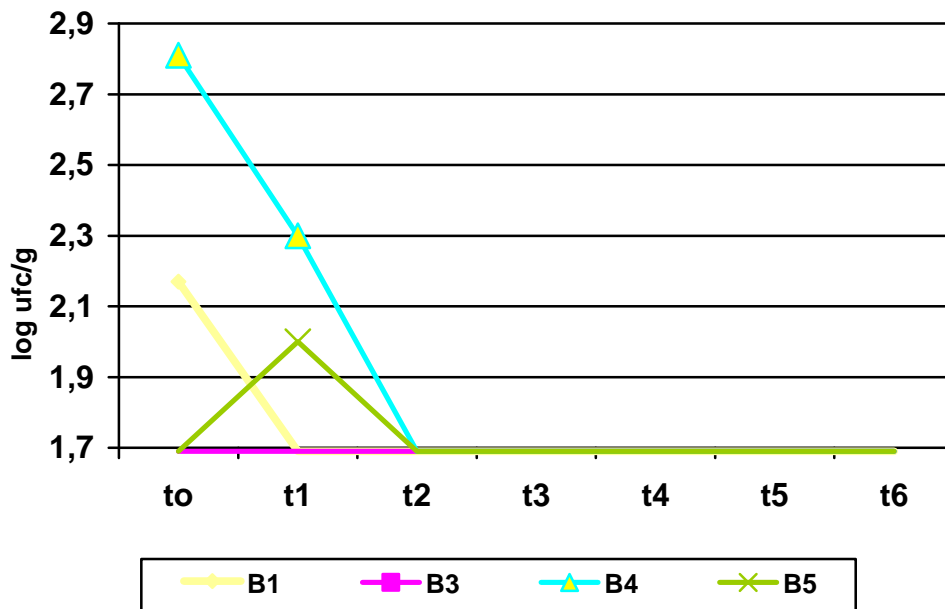
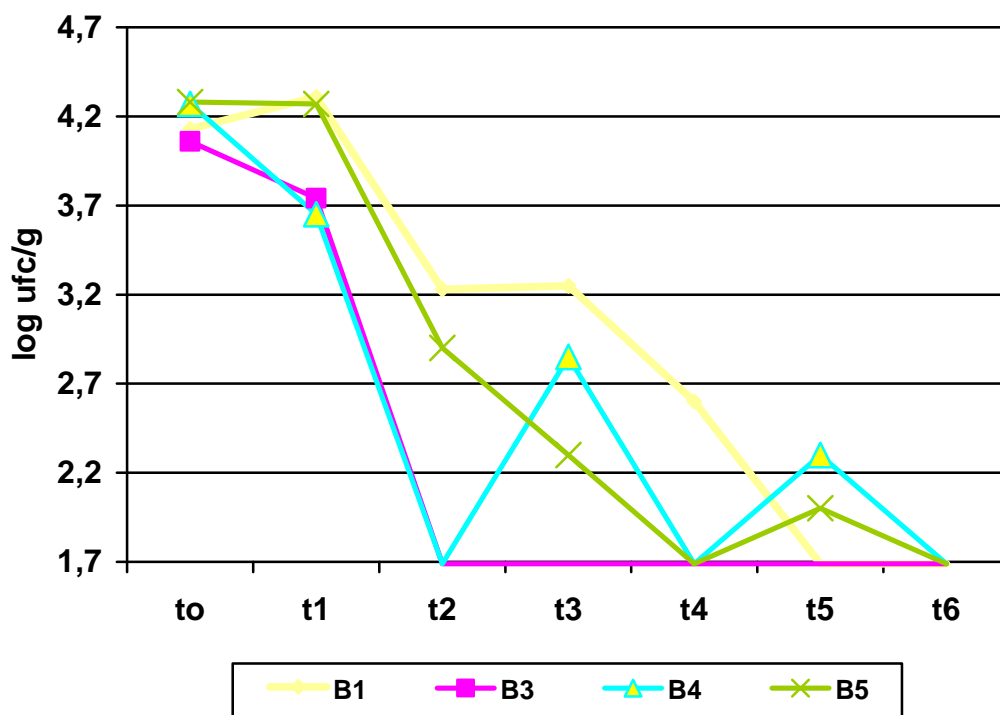


Figura VI.VIII. Evolución de las inoculaciones de  $10^5$  ufc de *Clostridium sporogenes* durante el proceso de elaboración de la cecina.



Antes de la inoculación se realizó un muestreo de todas las babillas para, tras enriquecimiento en caldo TPGY a 30 °C durante 5 días, descartar la presencia previa de *Clostridium sporogenes* u otros clostridios del cluster I que pudiesen ser detectados por la técnica de PCR con los mismos primers interfiriendo en los resultados de la investigación. Todos los resultados fueron negativos.

#### **VI.3.4. Incidencias**

Durante el desarrollo de este experimento parte de las cecinas sufrieron algún tipo de alteración que es considerado oportuno señalar por la posible influencia que estos datos pudiera tener sobre la interpretación de los resultados:

- la cecina n.º 1 al final de la maduración, sobre el sexto mes, estaba afectada por ácaros
- la cecina n.º 5 al principio de la maduración empezó a dar señales de podredumbre, siendo eliminada la parte más afectada, por lo que los datos referidos a partir del  $t_5$  para la concentración  $10^2$  están obtenidos de la cecina reserva.

#### **VI.4. Discusión**

Como parte de la valoración de la evolución de *Clostridium sporogenes* al ser inoculado en las babillas frescas para la elaboración de cecina, hemos considerado útil e importante tener en consideración aspectos físico-químicos y microbiológicos de las mismas que puedan influir en esta evolución.

Por lo que respecta al **pH** de las piezas de babilla utilizadas como materia prima en el proceso de elaboración de la cecinas, el pH inicial obtenido para las mismas oscila entre 5,42-5,63. Este parámetro físico-químico es uno de los más determinantes en la calidad tecnológica de la materia prima, pues tiene una gran influencia sobre las características organolépticas de la carne.

Suele estar comprendido, normalmente, entre 5,4 y 6,2 tras el desarrollo del *rigor mortis*, a las 24 horas del sacrificio. Valores alejados de este rango, tanto por encima como por debajo, dan lugar a alteraciones de la carne que repercuten sobre el resto del proceso de elaboración. En carnes con un pH muy bajo se produce una mayor desnaturalización de las proteínas miofibrilares y sarcoplasmáticas que afecta a la capacidad de retención de agua de la pieza, siendo esta menor, produciéndose rendimientos menores del producto y también menor absorción de sal. Por el contrario, un pH muy alto origina una excesiva capacidad de retención de agua, aumentando el riesgo de crecimiento microbiano, ya sea de alterantes o patógenos, en el producto.

Los valores iniciales habituales de pH de las piezas utilizadas en el proceso de elaboración de la cecina documentados por otros autores son bastante similares a los observados en nuestro estudio. En concreto, nuestro grupo de investigación, en un estudio realizado sobre el proceso de elaboración de 17 piezas de cecina, con la babilla como materia prima, el pH inicial de la mayoría de las mismas se encuentra dentro del rango de 5,42-5,63 (García *et al.*, 2008). En otro estudio realizado también específicamente sobre la cecina el pH inicial de las piezas estudiadas oscila entre 5,70 y 5,66 (Moliner, 2009).

Por lo que respecta a la evolución del pH a lo largo del proceso de elaboración, (figura VI.VI.) se puede comprobar que el pH permanece prácticamente estable a lo largo del mismo, con un ligero incremento al final de la maduración. Otro aspecto destacable es el anormal comportamiento del pH en la babilla n.º 5, que hacia el final del proceso dio claras muestras de putrefacción. En etapas iniciales se observó un comportamiento ligeramente diferente respecto al resto de las cecinas, como una disminución marcada del pH en el muestreo a mitad de etapa de asentamiento. Posteriormente, se produce una gran elevación del pH durante la maduración que ya corresponde con la putrefacción observada. Por otro lado, la babilla n.º 1, en la cual se observó la contaminación por ácaros durante el proceso de elaboración, también al final de la maduración presentó un pH muy elevado con indicios de putrefacción. De estas observaciones inferimos que la medición del pH durante el proceso de elaboración de la cecina es un indicador muy útil de alteración.

Por lo que respecta a las observaciones realizadas por otros autores sobre la evolución del pH, para García *et al.*, 1995, su variación a lo largo del proceso de elaboración de la cecina es mínima, oscilando entre 5,5 y 5,9, valores muy similares a lo observado por nosotros en las piezas no alteradas. Resultados similares han sido observados por Rubio, 2006. En el estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación sobre la cecina, también la gran mayoría de las piezas evaluadas presentaban un pH medio final entre los siete y ocho meses del proceso de elaboración de 5,83. Para Molinero, 2009, el pH medio final observado en las cecinas elaboradas con materia prima refrigerada es de 5,82, y con una media de 5,77 y 5,88 a los siete y ocho meses de elaboración para tres procesos de elaboración distintos en función de los ingredientes y aditivos utilizados.

Por lo tanto, el pH de la materia prima utilizada en el desarrollo de este experimental y la evolución del mismo durante el proceso de elaboración se corresponden con lo habitual, no debiendo constituir un factor de distorsión a la hora de valorar la evolución de *C. sporogenes* respecto a las condiciones normales de producción industrial o artesanal.

En cuanto a la **actividad de agua** de las babillas utilizadas en este experimental, el primer punto de muestreo donde fue valorado este parámetro corresponde con la salida del salado y después del lavado (punto  $t_1$ ) en el cual la  $a_w$  es 0,947. Este valor ya demuestra, si lo comparamos con el habitual de esta pieza de carne, 0,999 para García *et al.*, 2008 o 0,992-0,993 para Molinero, 2009, el efecto inicial de sal sobre la actividad de agua. Por otro lado, en esta misma fase, en el evaluación llevada a cabo por García *et al.*, 2008, tras el lavado a la salida del salado la actividad de agua media es 0,943, con un rango variable de 0,903 a 0,968, valor muy similar al observado en nuestro estudio.

Respecto a la evolución de la actividad de agua durante el proceso de elaboración, podemos observar en la tabla VI.III. que se produce un descenso paulatino y suave de la misma a lo largo de todo el proceso. Contradictoriamente, en relación al párrafo anterior, el punto  $t_1$  resulta bajo en

relación al resto de los puntos de muestreo posteriores. Estos resultados no corresponden con los observados en el estudio de García *et al.*, 2008. En la Tesis Doctoral de Molinero, 2009, se empieza a valorar la actividad de agua a partir del día 40 del proceso de elaboración, por lo que no podemos comparar nuestro resultado con los suyos. A partir del punto  $t_2$  la evolución de la actividad de agua sí corresponde con lo observado por los autores anteriormente citados.

Como ya se indicó en el apartado de material y métodos, la actividad de agua de todas las cecinas inoculadas se determinó al final del proceso, en el punto de muestreo  $t_6$  tras el secado (tabla VI.IV.). Los valores obtenidos se corresponden con lo habitual para este tipo de producto, una actividad de agua media de 0,901 con un rango de 0,837-0,936 (García *et al.*, 2008), y de 0,930 a los siete meses de curación (Molinero, 2009).

Por lo tanto, la evolución de la actividad de agua de las cecinas inoculadas y la actividad de agua final obtenida en nuestro experimental se corresponde con lo habitual para este tipo de productos, no debiendo suponer el proceso de elaboración realizado ninguna diferencia significativa sobre la evolución de *C. sporogenes* respecto a la elaboración habitual de la cecina.

Respecto al porcentaje final de **sal** obtenido fue 3,74 %. Este valor se corresponde con lo observado en el capítulo I de la presente Tesis y considerado como habitual para este tipo de producto. En el estudio realizado por García *et al.*, 2008, el valor medio de sal en este punto de muestreo es 2,65%, sin embargo, para Molinero, 2009, suele ser del 12 %, con un rango del 11% al 14 %. Debido a esta gran diferencia entre valores entre autores no vamos a tomar, para este parámetro, como referencia a ninguno de los dos y, dado que coincide con los valores observados en este propio experimental, lo consideraremos como adecuado y representativo del las cecinas presentes en el mercado y por tanto, no se considerará como un factor diferente de lo habitual en cuanto al comportamiento de *C. sporogenes*.



Por último, no fue detectado un contenido residual en **nitratos y nitritos** al final del proceso de elaboración. Estos resultados coinciden con la bibliografía consultada. Molinero, 2009, no detecta los nitritos en ningún punto del proceso de elaboración y los nitratos están presentes en pequeñas cantidades a lo largo del mismo. García *et al.*, 2008, sin embargo, no detectan los nitratos en la mayoría de las muestras evaluadas y sí cantidades muy residuales de nitritos.

Por todo ello, tanto como la composición, como las proporciones iniciales de las sales utilizadas en el proceso de elaboración de nuestras cecinas se corresponde con lo habitual para este tipo de productos. Por lo tanto consideramos que el efecto de estos componentes, en el proceso de elaboración utilizado, sobre el comportamiento de *C. sporogenes* se corresponde con el esperado para la producción industrial de cecina.

La **calidad microbiológica** inicial de las piezas de babilla puede observarse en la tabla VI.V., en la que los recuentos de microbiota aerobia mesófila viable están situados en torno a 8 log ufc/g. Los valores obtenidos pueden considerarse bastante elevados, especialmente si los comparamos con los valores aportados por otros autores sobre la misma materia prima. Los resultados obtenidos por García *et al.*, 2008, indican que su recuento medio de microbiota aerobia mesófila viable es de 5,90 log ufc/g, pero con un rango muy amplio de valores, entre 3,44-8,28 log ufc/g, habiendo encontrado notables diferencia entre la calidad microbiológica de las cecinas correspondientes a 17 industrias evaluadas. En el estudio de Molinero, 2009, los recuentos iniciales están en torno a 4,74-5 log ufc/g, que consideramos bastante inferiores a los habituales.

Respecto a los recuentos de enterobacterias de nuestras muestras, estos fueron bastante más elevados de lo esperado, superando los límites de recuento de la segunda dilución decimal. Estos resultados observados en nuestro estudio se corresponden con lo observado por García *et al.*, 2008, que obtuvieron un recuento medio de 3,79 log ufc/g. Sin embargo, Molinero, 2009, no detecta la presencia de enterobacterias en ninguna de las muestras

analizadas. Respecto a los coliformes, éstos se recontaron en la mayoría de las muestras por encima de 3 log ufc/g, y sólo en una de las muestras, la que mayores recuentos de microbiota mesófila aerobia viables y enterobacterias y coliformes presenta, se detectó la presencia de *E. coli*, en elevado número, 3,79 log ufc/g. Para el mismo estudio de García *et al.*, 2008, los coliformes fueron detectados en 14 de las 17 muestras analizadas, presentando unos recuentos medios de 3,10 log ufc/g en el resto y *E. coli* fue detectada en 11 de las muestras analizadas con un recuento medio de 2,48 log ufc/g.

En cuanto a la microbiota esporulada, tanto aerobia como anaerobia, nuestros resultados indican una elevada presencia de esporulados aerobios y ausencia de esporulados anaerobios. Un estudio similar es el realizado por García *et al.*, 2008, en el cual los datos obtenidos presentan una gran variabilidad. De las muestras analizadas no se detectó la presencia de esporulados aerobios en dos de las muestras analizadas, y de anaerobios en 12 de las mismas. En las muestras en las que sí son detectados los recuentos medios obtenidos son 3,55 log ufc/g. Lo curioso de estos resultados es su variabilidad, pues se dan casos donde se detectan esporulados aerobios y no los anaerobios y viceversa. Este hecho nos demuestra la importancia del entorno ambiental y de la higiene de las condiciones de trabajo sobre esta microbiota.

Respecto a la presencia de *Staphylococcus aureus* en la materia prima, este microorganismo no fue detectado en ninguna de las cinco babillas. Otro patógeno como *Listeria monocytogenes* fue detectado en todas las muestras. Y *Salmonella* spp. se encontró sólo en una de las muestras. En ninguna de las babillas fue detectada la presencia de *C. botulinum*.

Un importante aspecto a considerar sobre la discusión de la calidad microbiológica de nuestras muestras el origen único de las mismas, ya que todas ellas proceden del mismo matadero. Por esta razón, no podemos cuestionar la representatividad general de nuestros datos respecto a cada patógeno. Sí valorar que su calidad higiénica corresponda con la calidad estimada como habitual para este tipo de piezas.

En los resultados del experimental llevado a cabo por García *et al.*, 2008, *Staphylococcus aureus* fue detectado en cinco de las 17 muestras de babilla analizadas, *Listeria monocytogenes* se detectó en 12 de las 17 muestras, y *Salmonella* spp. sólo en 1 del total de muestras analizadas. Estos resultados resultan semejantes a los nuestros, con una baja presencia de *S. aureus*, una elevada detección de *L. monocytogenes* en las muestras y una baja detección de *Salmonella* spp.

Por otro lado, existen numerosos estudios específicos sobre la prevalencia de estos patógenos en carne fresca de vacuno. En el caso de *Staphylococcus aureus*, la prevalencia en carne de vacuno se estima en 6,9 %, con una prevalencia global en la carne cruda del 16,4 % (Hanson *et al.*, 2001). En cuanto a *Listeria monocytogenes*, existen numerosos estudios al respecto, tanto sobre su prevalencia como sobre su preocupante persistencia en el medio como fuente de contaminación de la carne cruda (Carpentier y Cerf, 2011). Respecto a la prevalencia de este patógeno en carne fresca de vacuno esta suele situarse entre un 10% (Rhoades *et al.*, 2009) y un 34,9 % para un estudio llevado a cabo en España (Vitas *et al.*, 2004). En cuanto a *Salmonella* spp., en el mismo estudio llevado a cabo por Rhoades *et al.*, 2009, la prevalencia de este patógeno en carne de vacuno fresca suele situarse en el 3,8 %. Respecto a *Clostridium botulinum*, como ya fue comentado en el capítulo V de este trabajo, los estudios realizados sobre los niveles de esporas presentes en los alimentos estimaron que, generalmente, son bajos en las carnes, menos de 10 esporas por kg y, a menudo, menos de 1/kg (Dodds, 1993b).

En conclusión, por todo lo discutido sobre la calidad microbiológica de la materia prima usada en este experimental, consideramos que únicamente presenta diferencias, respecto a la calidad microbiológica que podemos considerar como habitual para este tipo de piezas, en los elevados recuentos de microbiota mesófila aerobia viable. Desconocemos la influencia de esta característica sobre posibles diferencias en el comportamiento de *Clostridium sporogenes* inoculado respecto a piezas con recuentos inferiores. En cuanto a

todos los demás grupos microbianos valorados, las piezas pueden considerarse como adecuadas para el desarrollo del experimental.

Respecto a la evolución de los esporos de *C. sporogenes* inoculados sobre piezas de babilla utilizadas en la elaboración de cecina, los datos obtenidos quedan recogidos en la tabla VI.VI. y en las figuras VI.VII. y VI.VIII. En ambas figuras se puede observar que el punto crítico para la disminución y/o desaparición de los esporos inoculados es la fase de asentamiento, donde se produce el mayor descenso en los recuentos. En este aspecto hay un gran consenso entre los resultados observados en nuestro experimental y en el llevado a cabo por García *et al.*, 2008, en el cual se observa que el asentamiento es un punto crítico en el control de las poblaciones bacterianas de interés higiénico y sanitario.

Otro aspecto de interés que puede ser observado la figura VI.VIII. es el diferente comportamiento de las muestras n.º 1 y n.º 5, en los recuentos, respecto al resto de babillas inoculadas. La pieza n.º 1, que presentó una intensa contaminación con ácaros durante la fase de secado, en sus recuentos se puede observar que es la que menor control ejerce sobre el microorganismo, tanto en el asentamiento como en las etapas posteriores. Aunque *C. sporogenes* no pudo ser recuperado al final del proceso en ninguna de las muestras. Y como ya ha sido indicado anteriormente, la pieza n.º 5 dio señales de deterioro desde etapas tempranas del proceso de elaboración, y especialmente (ver figura VI.VIII.) podemos observar como esta babilla siempre presenta recuentos elevados en casi todos los puntos de muestreo, demostrando que una pieza con malas condiciones tecnológicas puede suponer un riesgo sobre el control de los posibles patógenos presentes.

La pieza n.º 3 presenta el mejor y más estable comportamiento en cuanto al control del esporulado. Sin embargo, la pieza n.º 4 presenta un comportamiento errático, especialmente a partir del punto  $t_3$  de muestreo, cuya causa desconocemos.

Por lo que respecta a la diferencia del comportamiento de los esporos en cuanto a la concentración del inóculo inicial, ésta queda patente al compararlos. En la figura VI.VII. se puede observar que no se recuperan esporos a partir del punto  $t_2$  de muestreo, sin embargo cuando el inóculo inicial es elevado ( $10^5$  ufc/g) tras el asentamiento se pueden recuperar los esporos en algunas de las muestras. Común a la diferente tasa de inoculación es que al final del proceso de elaboración no se recuperan esporos en ninguna de las muestras inoculadas, lo que supone una garantía de calidad higiénica del mismo respecto a este microorganismo.

Lara *et al.*, 2003, llevaron a cabo un experimento sobre la evolución de esporos de *Clostridium botulinum* inoculados en “charqui”, que podemos considerar similar a la cecina, durante el proceso de elaboración. Los datos físico-químicos de las piezas de “charqui” inoculadas también están recogidos en el ensayo, presentando unas diferencias respecto a las nuestras que es oportuno señalar. El pH de estas piezas es similar, evolucionando de 5,39 a 5,46, permaneciendo estable a lo largo del proceso, sin embargo el porcentaje de sal de las mismas es bastante superior al de nuestras cecinas, pues oscila del 10,11 % inicial a un 13,92 % final. La actividad de agua es también bastante inferior a lo observado en nuestro estudio, desde un 0,821 inicial a un 0,752 final. Por otro lado, hay una diferencia sustancial en el método de trabajo, pues en este ensayo se elabora el producto y del mismo se extraen piezas de 5 g que tras su depósito en un tubo estéril es inoculada con una concentración de 100 esporos/g de producto y se mantiene en condiciones de anaerobiosis a una temperatura de 35 °C durante 96 horas.

Por lo que respecta a los resultados obtenidos en dicho ensayo, en él observaron que los recuentos de esporos, al ser transferidos a un medio apropiado, durante todo el proceso, cuya duración desconocemos, permanecieron constantes, en un rango de 100 ufc/g. Por lo que infieren que los esporos no germinaron durante el proceso de elaboración, pero tampoco se vieron afectados por el mismo. Estos resultados son diferentes a lo observado por nosotros, que a los 20 días de iniciado el proceso los esporos no pueden ser recuperados, partiendo de una concentración similar de inóculo,  $10^2$  ufc/g.

Esta diferencia puede deberse por un lado a la gran diferencia entre las dos metodologías empleadas, y por otro, a las especiales características del “charqui”, donde la concentración de sal a la salida del salado ya es muy elevada, impidiendo en todo momento la germinación de los esporos. En nuestro caso, con una concentración de sal estimada, y documentada por otros autores como mucho más baja, entre 3-5 % (García *et al.*, 2008), podrían darse las condiciones para que los esporos germinen pero que no puedan desarrollarse al células vegetativas.

Por último, queremos destacar la utilidad de la técnica de PCR en la confirmación de las colonias *C. sporogenes*. La aplicación de esta técnica se llevó en las últimas etapas del proceso ante la modificación morfológica de las colonias recuperadas de este microorganismo.

Por todo lo expuesto concluimos que este experimento, desarrollado en condiciones muy aproximadas a la elaboración de habitual de la cecina, indica que la contaminación inicial de las piezas de babilla con esporos de *C. sporogenes*, como apatógeno de *C. botulinum*, es controlada, especialmente durante la fase de asentamiento, por las condiciones propias de las materias primas y del proceso de elaboración, no recuperándose células viables del microorganismo inoculado al final de los siete meses de elaboración.



## **CONCLUSIONES**





## CONCLUSIONES

**PRIMERA:** En la evaluación de productos cárnicos crudo-curados elaborados en Castilla y León, las medias obtenidas de los valores de los parámetros físico-químicos, pH y actividad de agua, se ajustan, en general, a los valores observados en la bibliografía consultada. Es el porcentaje de sal el parámetro donde mayores diferencias se han encontrado respecto a los valores establecidos por otros autores, donde el método usado para su determinación puede ser el factor fundamental de dicha diferencia. Los productos analizados cumplen la legislación vigente en cuanto al contenido residual de nitratos y nitritos, estando sus valores muy por debajo de los límites establecidos.

**SEGUNDA:** La calidad higiénica de los productos cárnicos analizados, en función de los recuentos de los grupos microbianos evaluados, indica una adecuada elaboración y manipulación de los mismos. Los grupos indicadores de contaminación fecal no han sido detectados en la mayoría de las muestras analizadas, presentando recuentos bajos en las muestras donde sí se aislaron.

**TERCERA:** La incidencia de patógenos de transmisión alimentaria observada en los productos cárnicos ha sido bastante baja. Por otro lado, tanto el porcentaje de presencia de los mismos como los recuentos obtenidos son parecidos a los datos publicados al respecto. La mayoría de los productos analizados presenta una adecuada calidad sanitaria.

**CUARTA:** El chorizo y el jamón presentan un comportamiento mejor en cuanto al control de *Staphylococcus aureus* inoculado que la cecina. Especialmente en este producto, pero también en el jamón y en el chorizo, se observa que las temperaturas elevadas de conservación, 20°C, dificultan el control del microorganismo, por lo que reiteramos la importancia de la conservación de los productos envasados a temperaturas de refrigeración. No se observan diferencias significativas entre la influencia de las dos atmósferas de conservación evaluadas, y sólo tras 180 días a 20°C en las muestras de cecina

conservadas en atmósfera modificada se obtienen recuentos a diferencia del resto de las muestras evaluadas.

**QUINTA:** El chorizo es el que mejor efecto de inhibición ejerce sobre el inóculo de *Listeria monocytogenes*, seguido del jamón. Destacamos que en la cecina, sin embargo, la contaminación durante el loncheado y envasado del producto supone un peligro potencial, según lo observado en nuestro estudio. Este producto no sólo no controla el crecimiento del patógeno, sino que permite su crecimiento hasta en dos unidades logarítmicas, llegando a recuentos que se establecen como umbral de la dosis infectiva para este microorganismo. Los resultados observados para la temperatura de conservación de los productos envasados indican que el frío parece mostrarse como un factor más de riesgo, especialmente en el chorizo y el jamón. Para los tres productos evaluados no se observan diferencias significativas entre ambas atmósferas de conservación, aunque resultados algo más elevados parecen encontrarse en las muestras conservadas en atmósfera modificada.

**SEXTA:** Respecto al comportamiento y evolución de las esporas de *Clostridium sporogenes* inoculadas en productos cárnicos, el chorizo ejerce un control de las esporas más inmediato que el jamón y la cecina, presentando estos dos últimos productos un comportamiento similar. No se han observado diferencias significativas de la influencia de las temperaturas de conservación o de las atmósferas de envasado sobre el control del clostridio. Una dosis elevada de inóculo inicial de *C. sporogenes* permite la supervivencia del microorganismo sobre la cecina durante un periodo mayor de tiempo, en este caso hasta el final de la vida útil de la misma.

**SÉPTIMA:** En nuestro experimento, desarrollado en condiciones muy aproximadas a la elaboración industrial de la cecina, la contaminación inicial de las piezas de babilla con esporas de *C. sporogenes*, como apatógeno de *C. botulinum*, es controlada, especialmente durante la fase de asentamiento, por las condiciones propias del proceso de elaboración, no recuperándose células viables del microorganismo inoculado al final de los siete meses de elaboración.

**OCTAVA:** La técnica de PCR nos ha resultado una herramienta rápida, específica y muy útil en la identificación de microorganismos. Además destacamos su sencillez de realización y bajo coste como ventajas de la misma respecto a otras técnicas de identificación. Como procedimiento de detección ha resultado especialmente útil en las muestras donde los sistemas microbiológicos clásicos para la detección de *C. sporogenes* no podían ofrecer resultados, como es el caso del chorizo. Aunque, por otro lado, hemos observado que puede ofrecer falsos positivos según el protocolo utilizado por nosotros.



**GLOSARIO  
DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS**



## **GLOSARIO DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS**

**ACMSF:** Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food (Reino Unido).

**AESAN:** Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición.

**ATCC:** America Type Culture Collection

**CE:** Comisión Europea.

**CECT:** Colección Española de Cultivos Tipo

**CDC:** Center of Disease Control and Prevention (USA).

**CSAN:** Center for Food Safety and Applied Nutrition (pertenece a la FDA, USA).

**CNE:** Centro Nacional de Epidemiología (España).

**EFSA:** European Food Safety Authority.

**FDA:** Food and Drug Administration (perteneciente al Departamento de Salud y Servicios Humanos, USA).

**FSIS:** Food Safety and Inspector Service (perteneciente al Departamento de Agricultura de USA).

**FIAB:** Federación Española de Industrias de Alimentación y Bebidas.

**ICMSF:** Internacional Comisión on Microbiological Specifications for Foods.

**IDSA:** Infectious Diseases Society of America.

**IFT:** Institute of Food Technologist (Illinois, USA).

**LCR:** Ligase Chain Reaction

**NASBA:** Nucleic Acid Sequence-Based Amplification

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**PCR:** Polymerase Chain Reaction.

**RAE:** Real Academia Española.

**RASFF:** Rapid Alert System for Food and Feed

**SDA:** Strand Displacement Amplification





## **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

- 20MINTUOS. 2006. Argal retira una partida de jamón ibérico tras un brote de botulismo en Vigo .Disponible en:  
<http://www.20minutos.es/noticia/133777/0/botulismo/jamon/argal>.  
Fecha acceso: 9-11-2010.
- ACMSF. 2000. Discussion Paper. Evaluation of the risk of growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in selected new products of concern. Disponible en:  
<http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acm479.pdf>. Fecha acceso: 14-11-2009.
- AESAN. 2005. Disponible en:  
[http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas\\_prensa/botulismo.shtml](http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/notas_prensa/botulismo.shtml). Fecha acceso: 11-11-2010.
- AESAN. 2009. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo asociado a la presencia de *Listeria monocytogenes* en pescado fresco o congelado. *Revista del comité científico* 10, 2740.
- AKANE, A., MATSUBARA, K., NAKAMURA, H., TAKAHASHI, S., KIMURA, K. 1994. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J. Forensic Sci.* 39, 362-372.
- AL-SOUD, W.A., JONSSON, L.J., Y RÅDSTROM, P. 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38, 345-350.
- AL-SOUD, W.A. Y RÅDSTRÖM, P. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J. Clin. Microbiol.* 39, 485-493.
- ALIÑO, M., GRAU, R., TOLDRÁ, F., BLESÁ, E., PAGÁN, M.J. Y BARAT, J.M. 2009. Influence of sodium replacement on physicochemical properties of dry-cured loin. *Meat Science* 83, 423-430.
- ALIÑO, M., GRAU, R., TOLDRÁ, F., BLESÁ, E., PAGÁN, M.J. Y BARAT, J.M. 2009. Physicochemical properties and microbiology of dry-cured loins obtained by partial sodium replacement with potassium, calcium and magnesium. *Meat Science* 85, 580-588.

- ANDREWS, W.H. Y HAMMACK, T.S. 2007. *Salmonella*. En: Bacteriological Analytical Manual *on line*, Chapter 5. Department of Health and Human Service, FDA.
- ANÓNIMO. 1988. Botulismo en España año 1987. Bol. Epidemiol. Sem. 1811.
- ANÓNIMO. 2007. PCR en la Industria Agroalimentaria. Disponible en: [http://www.cultek.com/inf/otros/noticias/Seminario\\_PCR\\_Industria\\_Agroalimentaria\\_microbial.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/noticias/Seminario_PCR_Industria_Agroalimentaria_microbial.pdf) Fecha acceso: 16-12-2010.
- ANÓNIMO. 2010. Monográfico productos cárnicos: La industria cárnica trabaja en tres líneas estratégicas: eje exterior, eje tecnológico y de innovación y eje de competitividad. *Alimentaria* 412, 40-62.
- ANONYMOUS. 1992. Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. Center for Food Safety and Applied Nutrition, U.S. Food and Drug Administration, Rockville, Md.
- ANONYMOUS. 2004. Microbiological Risk Assessment Series. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- APHA. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods 4<sup>th</sup> ed. En: Downes e Ito eds. American Public Health Association. Washington, D.C.
- ARNON, S.S., SCHECHTER, R., INGLESBY, T.V., HENDERSON, D.A., BARELETT, J.G., ASCHER, M., EITZEN, E., FINE, A.D., HAUER, J., LAYTON, M., LILLIBRIDGE, S., OSTERHOLM, M.T., O'TOOLE, E., PARKER, G., PERL, T.M., RUSSELL, P.K., SWERDLOW, D.L., TONAT, K. Y THE WORKING CROUP ON CIVILIAN BIODEFENSE. 2001. Botulinum toxin as a biological weapon. Medical and public health management. *JAMA* 285, 1059-1070.
- AYMERICH, T., MARTIN, B., GARRIGA, M. Y HUGAS, M. 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and non pathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. Environ. Micro.* 69, 4583-4594.
- AYMERICH, T., MARTIN, B., JOFRE, A., GARRIGA, M. Y HUGAS, M. 2004. La PCR ¿Complemento o alternativa a las técnicas clásicas de microbiología? en XIV Congreso de Microbiología de los Alimentos, Girona.
- BAEZ, L.A. Y JUNEJA, V.K. 1995. Nonradiative colony hybridization assay for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in raw beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 807-810.

- BAIRD-PARKER, A.C. Y FREAME, B. 1967. Combined effect of water activity, pH and temperature on the growth of *Clostridium botulinum* from spore and vegetative cell inocula. *J. of Appl. Microbiol.* 30, 420-429.
- BAKER, D.A. Y GENIGEORGIS, C.A. 1990. Predicting the safe storage of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of lag phase of growth. *J. Food Protect.* 53, 131-140.
- BARBOUR, W.M. Y TICE, G. 2001. Técnicas genéticas e inmunológicas para detectar microorganismos patógenos y toxinas de transmisión alimentaria, en Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. eds. *Microbiología de los alimentos: Fundamentos y fronteras.* Zaragoza, Acribia, 741-759.
- BARTLETT, J.M.S. Y STIRLING, D. 2003. A short History of the Polymerase Chain Reaction, en Bartlett, J.M.S. y Stirling, D. eds. *PCR Protocols.* 2.<sup>a</sup> ed. Totowa, New Jersey, Humana Press, 3-6.
- BASTIANELLO, P.C., ALVES DOS SANTOS, B., WAGNER, R., NASCIMIENTO, N. Y RODRIGUES, M.A. 2011. The effect of yeast addition on quality of fermented sausages at low NaCl content. *Meat Science* 87, 290-298.
- BAUMFORTH, K.R., NELSON, P.N., DIGBY, J.E., O'NEIL, J.D. Y MURRIA, P.G. 1999. Demystified ... the polymerase chain reaction. *Mol. Pathol.* 52, 1-10.
- BELLE, L. *et al.* 1998. Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: A limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *Thermus thermophilus* polymerase. *Muscle Nerve* 21, 1064-1067.
- BELL, C. Y KYRIAKIDES, A. 2005. *Clostridium botulinum.* Una aproximación práctica al microorganismo y su control. Ed. Acribia, Zaragoza.
- BENGTSON, I.A. 1922. Preliminary note on a toxin-producing anaerobe isolated from the larvae of *Lucilia Caesar.* *Public Health Rep.* 50, 164-170.
- BENITO, M.J., RODRÍGUEZ, M., MARTÍN, A., ARANDA, E., Y CÓRDOBA, J.J. 2004. Effect of the fungal protease EPg222 on the sensory characteristics of dry fermented sausage "salchichón" ripened with commercial starter cultures. *Meat Science* 67, 497-505.
- BENITO, M.J., MARTÍN, A., ARANDA, E., PÉREZ-NEVADO, F., RUIZ-MOYANO, S. Y CÓRDOBA, M.G. 2007. Characterization and selection of autochthonous Lactic Acid Bacteria isolated from tradicional Iberian dry-fermented salchichón and chorizo. *J. of Food Science* 72, 193-201.

- BENKERROUM, N., DAOUDI, A. Y KAMAL, M. 2003. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw sausages (merguez) in presence of a bacteriocin-producing lactococcal strain as a protective cultura. *Meat Science* 63, 479-484.
- BENLLOCH, A. 2011. Guía para la elaboración de programas de control de *Listeria monocytogenes* en la Industria Cárnica. Ed. Trotta Consulting y Betelgeux.
- BERGDOLL, M.S. 1990. Staphylococcal food poisoning. In D.O. Cliver Ed. *Foodborne diseases*, 85-106. San Diego, CA: Academic Press.
- BERMAN, N.C. 1976. Automated system for sodium nitrite, sodium nitrate and sodium chloride in meat products. *Proceedings Seventh Technicon International Congress*. New York.
- BERNALES, I. 2010. Curso de Análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real o Q-RT-PCR.
- BERTRAND, O., DELFAU, M.H., GARBARZ, M., PICAT, C., DEVAUX, I, DHERMY, D, BOIVIN, P. y GRANDCHAMP, B. 1989. An efficient laboratory made apparatus for DNA amplification. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 18, 227-235.
- BESSITTI, J. 2007. An introduction to PCR inhibitors. Disponible en: [www.promega.com](http://www.promega.com). Fecha acceso: 10-06-2010.
- BICKLEY, J., SHORT, J.K., MCDOWELL, D.G. Y PARKERS, H.C. 1996. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett. Appl. Microbiol.* 22, 153-158.
- BIDLAS, E. Y LAMBERT, R.J.W. 2008. Comparing the antimicrobial effectiveness of NaCl and KCl with a view to salt/sodium replacement. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 98-102.
- BILLE, J., CATIMEL, B., BANNERMAN, E., JACQUET, C., YERSIN, M.-N., CANIAUX, I., MONGET, D. Y ROCOURT, J. 1992. API Listeria, a new a promising one-day system to identify Listeria isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 1857-1860.
- BLAIOTTA, G., ERCOLINI, D., PENNACCHIA, C., FUSCO, V., CASABURI, A., PEPE, O. Y VILLANI, F. 2004. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus* spp. Strains isolated from meat and dairy products. Evidence for new variants of SEG and SEI in *S. aureus* AB-8802. *J. Appl. Microbiol.* 97, 719-730.
- BLESA, E., ALIÑO, M., BARAT, J.M., GRAU, R., TOLDRÁ, F. Y PAGÁN, M.J. 2008. Microbiology and physico-chemical of dry-cured ham during the post-salting

- stage as affected by partial replacement of NaCl by other salts. *Meat Science* 78, 135-142.
- BOVER-CID, S., BELLETTI, N., GARRIGA, M. Y AYMERICH, T. 2011. Response surface methodology to investigate the effect of high pressure processing on *Salmonella* inactivation on dry-cured ham. *Food Research International*.
- BOCyL (Boletín Oficial de Castilla y León). 1994. Orden de 17 de enero de 1994, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación Específica "Cecina de León" y su Consejo Regulador. BOCyL n.º 14, 21 enero de 1994, 444-450.
- BOCyL. 2008. Orden de 13 de febrero de 2008, por la que se aprueba el Reglamento de la Indicación Geográfica Protegida "Chorizo de Cantimpalos" y se crea su Consejo Regulador. BOCyL n.º 48, 10 marzo de 2008, 4477-4485.
- BOE (Boletín Oficial del Estado). 1994. Orden de 27 de junio de 1994 por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación Específica "Cecina de León" y su Consejo Regulador. BOE n.º 165, 12 de julio de 1994, 22286-22291.
- BOE. 2002. Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE n.º 44, 20 de febrero de 2002, 6756-6799.
- BOE. 2007. Real Decreto 1118/2007, de 24 de agosto, por el que se modifica el Real Decreto 142/2002, de 1 de febrero, por el que se aprueba la lista positiva de aditivos distintos de colorantes y edulcorantes para su uso en la elaboración de productos alimenticios, así como sus condiciones de utilización. BOE n.º 221, 37533-37544.
- BOERLIN, P., ROCOURT, J., GRIMONT, F., GRIMONT, P.A.D., JACQUET, C. Y PIFFARETTI, J.C. 1992. *Listeria ivanovii*, subsp. *londonensis* subsp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 42, 69-73.
- BORCH, E. Y ARINDER, P. 2002. Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Science* 62, 381-390.
- BORSON, N.D., STRAUSBAUCH, M.A., WETTSTEIN, P.J., ODA, R.P., JOHNSTON, S.L. Y LANDERS, J.P. 1998. Direct quantitation of RNA transcripts by competitive single-tube RT-PCR and capillary electrophoresis. *BioTechniques* 25, 130-137.
- BOVER-CID, S., BELLETTI, N., GARRIGA, M. Y AYMERICH, T. 2010. Model for *Listeria monocytogenes* inactivation on dry-cured ham by high hydrostatic



- pressure processing. *Food Microbiology*. Disponible en: [www.elsevier.com/locate/fm](http://www.elsevier.com/locate/fm) Fecha acceso: 19-10-2010.
- BRASIL. 1997. Decreto lei n. 2244. 05/06/97. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Productos de Origen Animal. Brasilia: Ministério de Agricultura.
- BREMER, V., LEITMEYER, K., JENSEN, E., METZEL, U., MECZULAT, H., WEISE, E., WERBER, D., TSCHAEPE, H., KREIENBROCK, L., GLASER, S. Y AMMON, A. 2004. Outbreak of *Salmonella* Goldcoast infections linked to consumption of fermented sausage, Germany 2001. *Epidemiol. Infect.* 132, 881-887.
- BRENNER, F.W., VILLAR, R.G., ANGULO, F.J., TAUXE, R. Y SWAMINATHAN, B. 2000. *Salmonella* nomenclatura. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2465-2467.
- BRIN, M.F. 1997. Botulinum toxin: chemistry, pharmacology, toxicity and immunology. *Muscle nerve* 20, (supl. 6), s146-s168
- BROCK, T.D. Y FREEZE, H. 1969. *Thermus aquaticus*, a Nonsporulating Extreme Thermophile. *J. Bact.* Vol 98, 289-297.
- BRODY, A.L. 1996. Envasado de alimentos en atmósferas controladas, modificadas y a vacío. Editorial Acribia.
- BROWNIE, J., SHAWCROSS, S., THEAKER, J., WHITCOMBE, D., FERRIE, R., NEWTON, C. Y LITTLE, S. 1997. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. *Nucleic Acid Res.* 25, 3235-3241.
- BRUNATTI, C. Y MARTÍN, A.M. 2011. Equilibrio de precipitación. Disponible en: <http://materias.fi.uba.ar/6305/download/EQUILIBRIO%20DE%20PRECIPITACION.pdf> Fecha acceso: 20/10/2011.
- BRYAN, F.L. 1976. *Staphylococcus aureus*. En M.P. De-Figueredo & D. F. Splittstoesser Eds. *Food Microbiology: public health and spoilage aspects*, 12-128. Westport, CT: AVI Publishing Co Inc.
- BRYAN, F.L. 1988. Risks associated with vehicles of food pathogens and toxins. *J. Food Protect.* 51, 498-508.
- BURKE, G.S. 1919. Notes on *Bacillus botulinus*. *J. Bacteriol.* 4, 555-565.
- BURNHAM, G.M., HANSON, D.A., KOSHICK, C.M. Y INGHAM, S.C. 2008. Death of *Salmonella* serovars, *Escherichia coli* 0157:H7, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* during the drying of meat: A case study using biltong and droewors. *J. Food Safety.* 28, 198-209.

- BUSTA, F.F., SUSLOW, T.V., PARISH, M.E., BEUCHAT, L.R., FARBER, J.N., GARRET, E.H. Y HARRIS, L.J. 2003. The use of indicators and surrogate microorganisms for the evaluation of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive reviews in Food Science and Food Safety*, vol. 2, 179-185.
- BUSTIN, S.A. 2004. Meaningful Quantification of mRNA Using Real-Time PCR en Weissensteiner, T., Griffin, H.G. y Griffin, A. Ed., PCR Technology. Current Innovations. USA, CRC. 225-233.
- BYELASHOV, O.A., CARLSON, B.A., GEORNARAS, I., KENDALL, P.A., SCANGA, J.A. Y SOFOS, J.N. 2009. Fate of post-processing inoculated *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged pepperoni stored at 4, 12 y 25°C. *Food Microbiology* 26, 77-81.
- CAMPBELL, K.D., COLLINS, M.D. Y EAST, A.K. 1996. Gene probes for identification of the botulinal neurotoxin gene and specific identification of neurotoxin types B, E and F. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2255-2262.
- CAMPUS, M., FLORES, M., MARTÍNEZ, A. Y TOLDRÁ, F. 2008. Effect of high pressure treatment on colour, microbial and chemical characteristics of dry cured loin. *Meat Science* 80, 1174-1181.
- CANN, D.C., WILSON, B.B., HOBBS, G. ET AL. 1965. The incidence of *Clostridium botulinum* type E in fish and botton deposits in the North Sea and off the coast of Scandinavia. *J. App. Bacteriol.* 28, 426-430.
- CAPITA-GONZÁLEZ, R. 1997. Listeriosis transmitida por alimentos. En: Actualización en microbiología sanitaria de los alimentos. Colegio Oficial de Farmacéuticos de León, León.
- CAPITA, R. 1998. Tesis Doctoral: Calidad higiénica y sanitaria de la carne de pollo con atención especial a *Listeria monocytogenes*. Ensayos de descontaminación. Universidad de León.
- CAPITA, R. 2008. Jornada: "El problema de Listeria en la Industria Cárnica". *Revista ACTA/CL*, 37, 4-15.
- CAPITA, R., ALONSO-CALLEJA, C., GARCÍA-ARIAS, M.T., GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C. Y MORENO, B. 1999b. Aspectos de interés en la calidad microbiológica de la carne de pollo. *Eurocarne* 73, 73-86.
- CARBALLO, B.M. Y LÓPEZ DE LA TORRE, G. 1991. Manual de bioquímica y tecnología de la carne. Madrid. Eds. A. Vicente.

- Cariello, N.F., Swenberg, J.A., Skopek, T.R. 1991. Fidelity of *Thermococcus litoralis* DNA polymerase (Vent) in PCR determined by denaturing gradient gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* 19 (15), 4193-4198.
- CARLIN, F., BROUSSOLLE, V., PERELLE, S., LITMAN, S. Y FACH, P. 2004. Prevalence of *Clostridium botulinum* in food raw materials used in REPFEDs manufactured in France. *Int. J. of Food Microbiol.* 91, 141-145.
- CARPENTIER, B. Y CERF, O. 2011. Review – Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int. J. of Food Microbiol.* 145, 1-8.
- CASQUETE, R., BENITO, M.J., MARTÍN, A., RUIZ-MOYANO, S., ARANDA, E. Y CÓRDOBA, M.G. 2012. Microbiological quality of salchichón and chorizo, traditional Iberian dry-fermented sausages from two different industries, inoculated with autochthonous starter cultures. *Food Control* 24, 191-198.
- CATO, E.P., GEORGE, W.L. Y FINEGOLD, S.M. 1986. Genus *Clostridium*. *En: Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. y Holt, J.G. eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. Baltimore, The Williams & Wilkins Co. 1141-1200.
- CAYA, J.G., AGNI, R. Y MILLER, J.E. 2004. *Clostridium botulinum* and the clinical laboratorian: a detailed review of botulism including biological warfare ramifications of botulinum toxin. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 128, 653-662.
- CHAMBERLAIN, J.S., GIBAS, R.A., RANIER, J.E. NGUYEN, P.N. Y CASKEY, C.T. 1988. Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res.* 16, 11141-11156.
- CHANG, F. S., HUANG, T.C. Y PEARSON, A.M. 1996. Control of the deshydration process in production of intermediate moisture meat products: a review. *Advances in Food Nutrition Research*, 29, 71-161.
- CHARLIER, C., CRETENET, M., EVEN, S. Y LE LOIR, Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *Int. J. of Food Protect.* 131, 30-39.
- CHEN, Y., ROSS, W.H., GRAY, M.J., WIEDMANN, M., WHITNIG, R.C. Y SCOTT, V.N. 2006. Attributing risk to *Listeria monocytogenes* subgroups: dose response in relation to genetic lineages. *J. Food Prot.* 69, 570-577.
- CHERINGTON, M. 2004. Botulism: update and review. *Semin. Neurol.* 24, 155-163.
- CHIEN, A., EDGAR, D.B. AND TRELA, J.M. 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J. Bact.* Vol. 174, 1550-1557.

- CHRISTIANSEN, L.N. Y FOSTER, E.M. 1965. Effect of vacuum packaging on growth of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in cured meats. *Appl. Microbiol.* 13, 1023-1025.
- CHRISTIANSE, L.N., TOMPKIN, R.B, SHAPARIS, A.B., ET AL. 1975. Effect of sodium nitrite and nitrate on *Clostridium botulinum* growth and toxin production in a summer style sausage. *Journal of Food Science* 40, 488-490.
- CHRISTINE, C.G. 2004. Life beyond PCR: alternative target amplification technologies for the diagnosis of infectious diseases, part II. *Clin. Microbiol. Newsletter* 26, 129-136.
- CHURCH, N. 1994. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. *Trends in Food Sciencie & Technology* 5, 345-352.
- CE. 2005. Comisión Regulation (CE) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Oficial Journal of the European Union* L338, 1-26
- CDC. 1983. Interstate common-source outbreak of staphylococcal food poisoning. North. Pennsylvania. Atlanta, Ga., *MMWR.*, 32 (14), 183-189.
- CDC. 1998. Botulism in the United States, 1899-1996. En: Handbook for Epidemiologist, Clinicians and Laboratory Workers. Centers of Disease Control and Prevention, Atlanta, Ga.
- CDC. 2010. *Salmonella* Montevideo infections associated with salami products made with contaminated imported black and red pepper---United States, July 2009---April 2010.  
Disponible en: [www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5959a3.htm](http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5959a3.htm). Fecha acceso: 17-05-2010.
- CFSAN. 1992. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, Rockville, MD, USA.
- CFSAN/FSIS. 2003. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/lmr2-tco.html>. Fecha acceso: 25-05-2006.
- CILLA, I., MARTÍNEZ, J., BELTRÁN, J.A. Y RONCALÉS, P. 2006. Effect of low-temperature preservation on the quality of vacuum-packaged dry-cured ham: Refrigerated boneless ham and frozen ham cuts. *Meat Science* 73, 12-21.

- CLAIRE, B., SMITH, J.P., EL-KHOURY, W., CAYOUE, B., NGADI, M., BLANCHFIELD, B., AUSTIN, J.W. 2003. Challenge studies with *Listeria monocytogenes* and proteolytic *Clostridium botulinum* in hard-boiled eggs packaged under modified atmospheres. *Food Microbiology*, 21, 132-141.
- CNE. 2008. Brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. España, 2004-2007 (excluye brotes hídricos). *Boletín Epidemiológico Semanal*. n.º 21, 241-252.
- CNE. 2009. Infecciones por Salmonella no tifoidea de origen humano en España. Sistema de Información Microbiológica. Años 2000-2008. ). *Boletín Epidemiológico Semanal*. n.º 17, 193-204.
- CNE. 2010. Estado de las enfermedades de declaración obligatoria. *Boletín Epidemiológico Semanal* n.º 18, 109-112.
- COLLEL, C., GOU, P., PICOUE, P., ARNAU, J. Y COMAPOSADA, J. 2010. Feasibility of near-infrared spectroscopy to predict aw and moisture and NaCl contents of fermented pork sausages. *Meat Science* 85, 325-330.
- COLLINS, M.D. Y EAST, A.K. 1998. Phylogeny and taxonomy of the food-borne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. *J. Appl. Microbiol.* 84, 5-17.
- COLLINS, M.D., LAWSON, P.A., WILLEMS, A., CORDOBA, J.J., FERNÁNDEZ-CARAYZABAL, J., GARCÍA, P., HAI, J., HIPPE, H. Y FARROW, J.A.W. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44, 812-826.
- COMI, G., URSO, R., IACUMIN, L., RANTSIOU, K., CATTANEO, P., CANTONI, C. Y COCOLIN, L. 2005. Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. *Meat Science* 69, 381-392.
- COMPTON, J. 1991. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature* 350, 91-92.
- COOK, N. DAVID, R., LLOYD, J., JOHN, I. Y MARIA, P. Unexpected detection of DNA by nucleic acid sequence-based amplification technique. *Mol. Cell. Probes* 18, 251-253.
- COOPERATIVA. 2009. ISP identificó a nueva empresa de alimentos contaminados con listeria. Disponible en: [http://www.cooperativa.cl/isp-identifico-a-nueva-empresa-de-alimentos-contaminados-con-listeria/prontus\\_notas/2009-04-13/171814.html](http://www.cooperativa.cl/isp-identifico-a-nueva-empresa-de-alimentos-contaminados-con-listeria/prontus_notas/2009-04-13/171814.html). Fecha acceso: 25-10-2010.
- COUTARD, F., POMMEPUY, M., LOAEC, S. Y HERVIO-HEATH, D. 2005. mRNA detection by reverse transcription-PCR for monitoring viability and potential

- virulence in a pathogenic strain of *Vibrio parahaemolyticus* in viable but nonculturable state. *J. Appl. Microbiol.* 98, 951-961.
- COWAN, S.T. 2004. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria 3<sup>ed</sup>. En: Barrow y Feltham eds. Cambridge, Cambridge University Press.
- CROSA, J.H., BRENNER, D.J., EWING, W.H. Y FALKOW, S. 1973. Molecular relationships among the Salmonelleae. *Journal of Bacteriology* 115, 307-315.
- D'AOUST, J.-Y. Y MAURER, J. 2007. *Salmonella* Species. En *Food Microbiology and Frontiers*, 3<sup>rd</sup> ed. Edited by Doyle, M.P. and Beuchat, L.R. ASM Press, Washington, D.C.
- Dack, G.M., Cary, W.E., Woolpert, O. et al. 1930. An outbreak of food poisoning proved to be due to a yellow haemolytic staphylococcus. *J. Prev. Med.* 4:167-175.
- DE CESARE, A., MIONI, R Y MANFREDA, G. 2007. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in fresh and fermented Italian sausages and ribotyping of contaminating strains. *Int. J. of Food Microbiol.* 120, 124-130.
- DEBRUYNE, L., SAMYN, E., DE BRANDT, E., VANDENBERG, O., HEYNDRICKX, M. Y VANDAMME, P. 2008. Comparative performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Research in Microbiology* 159, 88-93.
- DEZFULIAN, M., MCCROSKEY, L.M., HATHEWAY, C.L. Y DOWELL, V.R. Jr. 1981. Selective medium for isolation of *Clostridium botulinum* from human feces. *J. Clin. Microbiol.* 13, 526-531.
- DEMEKE, T. AND ADAMS, R.P. 1992. The effects of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *Biotechniques* 12, 332-334.
- DÍAZ, N. 2003. Herramientas biotecnológicas basadas en la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa, para identificación de especies en productos alimenticios (especies vegetales en piensos, caballo y pavo). Ponferrada (León), Universidad de León.
- Díaz, R.S., Sabino, E.C. 1998. Accuracy of replication in the polymerase chain reaction. Comparison between *Thermotoga maritime* DNA polymerase and *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Braz. J. Med.* 31, 1239-1242.
- Dinges, M.M., Orwin, P.M. and Schliever, P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Review*, 13, 16-34.

- DIXIT, A. DHAKED, R.K., ALAM, S.I. Y SINGH, L. 2005. Characterization of *Clostridium* sp. RKD producing botulinum-like neurotoxin. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 405-414.
- DODDS, K.L. 1993a. *Clostridium botulinum* in the environment. *En:* Hauschild, A.H.W. y Dodds, K.L. eds. *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods*. New York, Marcel Dekker. 21-51.
- DODDS, K.L. 1993b. *Clostridium botulinum* in foods. *En:* Hauschild, A.H.W. y Dodds, K.L. eds. *Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods*. New York, Marcel Dekker. 53-68.
- DOUE (Diario Oficial de la Unión Europea). 1995. Directiva 95/2/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de febrero de 1995 relativa a aditivos alimentarios distintos de los colorantes y los edulcorantes. DOUE n.º 61, 18 de marzo de 1995.
- DOUE. 1996. Reglamento (CE) n.º 1107/96 de la Comisión, de 12 de junio de 1996, relativo al registro de las indicaciones geográficas y de las denominaciones de origen con arreglo a lo establecido en el artículo 17 del Reglamento CEE n.º 2081/92 del Consejo. DOUE n.º 148, 21 de junio de 1996.
- DOUE. 2005. Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DOUE n.º 338, 22 de diciembre de 2005.
- DOUE. 2007. Reglamento (CE) n.º 1441/2007 de la Comisión, de 5 de diciembre de 2007, que modifica el Reglamento (CE) n.º 2073/2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. DOUE n.º 322, 7 de diciembre de 2007.
- DOUE. 2010. Reglamento (UE) n.º 257/2010 de la Comisión, de 25 de marzo de 2010, por el que se establece un programa para la reevaluación de aditivos alimentarios autorizados de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo sobre aditivos alimentarios. DOUE n.º 80, 26 de marzo de 2010.
- DOUE. 2010. Reglamento (UE) n.º 365/2010 de la Comisión, de 28 de abril de 2010, que modifica el Reglamento 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en lo que respecta a las enterobacteriáceas en productos lácteos líquidos pasteurizados y a *Listeria monocytogenes* en la sal de cocina. DOUE n.º 107, 29 de abril de 2010.

- DOLMAN, E.C. 1964. Botulism as a world health problem. *En*: Lewis, K.H. y Cassel, K. eds. Botulism. Washington D.C., U.S. Public Health Service.
- DOMÍNGUEZ, M. 2005. Revisión: La toxina botulínica como medicamento. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71, 387-427.
- DROSINOS, E.H., MATARAGAS, M., XIRAPHI, N., MOSCHONAS, G., GAITIS, F. Y METAXOPOULOS, J. 2005. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage. *Meat Science* 39, 307-317.
- DREVETS, D.A. Y BRONZE, M.S. 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* 53, 151-165.
- DUNCAN, CL. AND FOSTER, EM. 1968. Role of curing agents in the preservation of shelf-stable canned meat products. *Appl. Microbiol.* 16, 401-405.
- DUMITRASCU, C. Y DUMITRESCU, B. 2010. Urban industry intra-regional disparities of the south-west development region (Romania). Present-day dynamics and evolution trends.  
Disponibile en: <http://www.balwois.com/balwois/administration/full-paper/ffp-1710.pdf> Fecha acceso: 8-11-2010.
- DÜRE, P. 2005. Handbook of Clostridia. Boca Ratón, Florida, CRC Press.
- ECKHART, L., BACH, J., BAN, J. Y TSCHACHLER, E. 2000. Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 271, 726-730.
- EFSA. 2006b. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004. ISSN 1830-5458. European Food Safety Authority, Parma, Italy. Disponible en: [http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/monitoring\\_zoonoses/report/1277.Par.0022.File.dat/zoonoses2004-levels1-2part.pdf](http://www.efsa.europa.eu/etc/medialib/efsa/science/monitoring_zoonoses/report/1277.Par.0022.File.dat/zoonoses2004-levels1-2part.pdf). Fecha acceso: 10-12-2006.
- EFSA. 2007a. European Food Safety Authority Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Commission on Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. *The EFSA Journal*, 599, 1-42.



- EFSA. 2007b. The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2006. *The EFSA Journal* 2007, 130, 2-352.
- EFSA. 2008. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on Overview of methods for source attribution for human illness from foodborne microbiological hazards. *The EFSA Journal*, 764, 1-43.
- EFSA Y ECDC. 2009. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *The EFSA Journal*, 223. 1-320.
- EFSA. 2010. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA J.* 1496, 1-288.
- EILERT, S.J. 2005. New packaging technologies for the 21<sup>st</sup> century. *Meat Science*, 71. 122-127.
- EKLUND, M.W. 1992. Control in fishery products. *En: Hauschild A.H.W. and Dodds K.L. eds. Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods.* New York, Marcel Dekker. 209-232.
- ELÍAS, M. Y CARRASCOSA, A.V. 2000. Microbiological and physicochemical aspects of vacuum-packed Iberian ham. Effect of processing and slicing methods. *Fleischwirtschaft International* 2, 36-41.
- ELÍAS, M. Y CARRASCOSA, A.V. 2010. Characterisation of the *Paio do Alentejo*, a traditional Portuguese Iberian sausage, in respect to its safety. *Food Control* 21, 97-102.
- ERKKILÄ, S., SUIHKO, M.L., EEROLA, S., PETÄJ, E., Y MATTILA-SANDHOLM, T. 2001. Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Int. Food Microbiol.* 64, 205-210.
- EUZÉBY, J.P. 1999. Revised *Salmonella* nomenclature: designation of *Salmonella enterica* (ex Kauffman and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987 sp. nov., nom. rev. as the neotype species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 (approved list 1980), rejection of the name *Salmonella cholerasuis* (Smith 1894) Weldin 1927 (approved list 1980), and conservation of the name *Salmonella typhi* (Schoeter 1886) Warren and Scott 1930 (approved lists 1980). Request for an opinion. *Int. J. of Syst. Bacteriol.* 49, 927-930.

- FAIRCHILD, A., LEE, M.D. Y MAURER, J.J. 2006. PCR basis, en Maurer J.J. ed., PCR Methods in Foods. New York, Springer, 1-25.
- FAO/OMS. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat-foods. FAO/OMS, Roma y Ginebra. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra\\_listeria/en/index.html](http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra_listeria/en/index.html).  
Fecha acceso: 05-11-07.
- FARDER, J., COATES, E., BEAUSOLEIL, N. Y FOURNIER, J. 1991. Feeding trials of *Listeria monocytogenes* with a nonhuman primate model. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2606-2608.
- FARBER, J.M. Y PETERKIN, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 476-511.
- FDA/CFSAN. 2001. Chapter 6. Microbiological Challenge Testing. Disponible en: [www.cfsan.fda.gov/~comm./ift-6.html](http://www.cfsan.fda.gov/~comm./ift-6.html) Fecha acceso: 9-11-2010.
- FDA/FSIS. 2003. Food and Drug Administration/Food Safety and Inspection Service. Quantitative assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories or ready-to-eat foods. Disponible en <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html>. Fecha acceso: 25-10-2010.
- FIAB. 2009. Primer Barómetro del Sector de la Alimentación. [http://www.fiab.es/archivos/documentoNoticia/documentonoticia\\_20100525165235.pdf](http://www.fiab.es/archivos/documentoNoticia/documentonoticia_20100525165235.pdf) Fecha acceso: 25-05-10.
- FONSECA, B. 2009. Efecto de la adición de fosfatos y efecto de diversas condiciones de envasado, a vacío y con atmósferas modificadas, y almacenamiento sobre la calidad de los embutidos crudos curados. León, Universidad de León, Tesis Doctoral.
- FORAN, P.G., MOHAMED, N., LISK, G.O., NAGWANNEY, S., LAWRENCE, G.W., JOHNSON, E., SMITH, L., AOKI, K.R. Y DOLLY, J.O. 2003. Evaluation of the therapeutic usefulness of botulinum neurotoxin B, C1, E Y F compared with the long lasting type A-Basis for distinct durations of inhibition of exocytosis in central neurons. *J. Biol. Chem.* 278, 1363-1371.
- FORSYTHE, S.J. 2000. Food poisoning microorganisms. En The microbiology of safe food. Blackwell Science, Ltd., Oxford: pp. 142-192.
- FOX, C.K., KEET, C.A. Y STROBER, J.B. 2004. Recent advances in infant botulism. *Pediatr. Neurol.* 32, 149-154.

- FRANCIOSA, G., AURELI, P. Y SCHECHTER, R. 2003. *Clostridium botulinum*. En: Miliotis, M.D. y Bier, J.W. eds. *International Handbook of Foodborne Pathogens*. New York, Marcel Dekker. 61-89.
- FRANCO, B. D.G.M., LANDGRAF, M., SHIMOKOMAKI, M. & AZEVEDO, C.H.M. 1987. Condições higienico-sanitárias do charque comercializado em Sao Paulo, Brasil. *Revista de Microbiología*, 18, 98-102.
- FSIS. 2002. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental samples.  
Disponibile en: [http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/MIg\\_8\\_04.pdf](http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/MIg_8_04.pdf). Fecha acceso: 25-05-06.
- FSIS. Compliance guidelines to control *Listeria monocytogenes* in post-lethality exposed ready-to-eat meat and poultry products. 2006. FDA/FSIS.
- FSIS. 2008. Parameters for Inoculated Pack/Challenge Study Protocols Disponible en: [http://www.fsis.usda.gov/about\\_Fsis/NACMCF\\_subcommittee\\_Inoculated\\_Pack/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/about_Fsis/NACMCF_subcommittee_Inoculated_Pack/index.asp) Fecha acceso: 15-02-2012.
- FULLADOSA, E., GARRIGA, M., MARTÍN, B., GUÀRDIA, M.D., GARCÍA-REGUEIRO, J.A. Y ARNAU, J. 2010. Volatile profile and microbiological characterization of hollow defect in dry-cured ham. *Meat Science* 86, 801-807.
- FURRER, B., CANDRIAN, U., HOEFELEIN, CH. Y LUETHY, J. 1991. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemoysin gene fragments. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 372-379.
- GARCÍA DE FERNANDO, G.D., NYCHAS, G.J.E., PECK, M.W. Y ORDOÑEZ, J.A. 1995. Growth/survival of psychrotrophic pathogens of meat packaged under modified atmospheres. *Int. J. of Food Microbiol.* 28, 221-231.
- GARCÍA, M.C., SANZ, J.J. Y RENDUELES, E. 2008. Los riesgos relacionados con alimentos cárnicos de especial relevancia en Castilla y León. La cecina de León. Agencia de Protección de la Salud y Seguridad Alimentaria. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad.
- GARCÍA, I, ZUMALACÁRREGUI, J.M. AND DÍEZ, V. 1995. Microbial succession and identification of *Micrococcaceae* in dried beef, cecina, an intermediate moisture meat product. *Food Microbiology*, 12, 309-315.
- GARCÍA-ESTEBAN, M., ANSORENA, D. Y ASTIASARÁN, I. 2004. Comparison of modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period storage

- of dry-cured ham: effects on colour, texture and microbiological quality. *Meat Science* 67, 57-63.
- GARCÍA-HERRERO, I. 1994. Maduración de la cecina de vacuno: parámetros químicos y microbiológicos. Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral.
- GARCÍA IGLESIAS, E., GAGO CABEZAS, L., FERNÁNDEZ NUEVO, J. L. 2006. Tecnologías de envasado en atmósfera protectora. Informe de vigilancia tecnológica.
- GARCÍA-REY, R.M., GARCÍA-GARRIDO, J.A., QUILES-ZAFRA, R., TAPIADOR, J. Y LUQUE DE CASTRO, M.D. 2004. Relationship between pH before salting and dry-cured ham quality. *Meat Science*, 625-632.
- GARDNER, G.A., CARSON, A.W. Y PATTON, J. 1967. Bacteriology of Prepacked Pork with Reference to the Gas Composition within the Pack. *Journal of Applied Bacteriology*, Vol. 30, 321-333.
- GENIGEORGIS, C. 1981. Factors affecting the probability of growth of pathogenic microorganisms in foods. *JAVMA* 179, 1410-1417.
- GENIGEROGIS, C.A. 1989. Present state of Knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.* 9, 327-360.
- GERNER-SMIDT, P., ETHELBERG, S., SCHIELLERUP, P., CHRISTENSEN, J.J., ENGBERG, J., FUSSING, V., JENSEN, A., JENSEN, C., PETERSEN, A.M. Y BRUUN, B.G. 2005. Invasive listeriosis in Denmark 1994-2003: a review of 299 cases with special emphasis on risk factors for mortality. *Clinical Microbiology and Infection*, 11, 618-624.
- GIBBS, P.A., DAVIES, A.R. Y FLETCHER, R.S. 1994. Incidence and growth of psychrotrophic *Clostridium botulinum* in foods. *Food Control* 5, 5-10.
- GILL, C.O. Y MOLIN, G. 1998. Modified atmospheres and vacuum packaging. En: Food Preservatives. N.J. Russell and G.W. Gould, eds. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers Inc. 172-199.
- GILL, C.O. Y REICHEL, M.P. 1989. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high-pH beef packaged under vacuum or carbon dioxide. *Food Microbiol.* 6, 223-230.
- GIMÉNEZ, D.F. Y CICCARELLI, A.S. 1970. Another type of *Clostridium botulinum*. *Zentralbl. Bakt. I., Abt. Orig.* A 215, 221-224.

- GIOVANNINI, A., PRENCIPE, V., CONTE, A., MARINO, L., PETRINI, A., POMILIO, F., RIZZI, V. Y MIGLIORATI, G. 2004. Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in an Italian region. *Food Control* 15, 139-144.
- GIOVANNINI, A., MIGLIORATI, G., PRENCIPE, V., CALDERONE, D., ZUCCOLO, C Y COZZOLIN, P. 2006. Risk assessment for listeriosis in consumer of Parma and San Daniele hams. *Food Control* 18, 789-799.
- GISBERT, M., GOU, P., PASCUAL, A. Y LÓPEZ, N. 2000. Water difusión in dry-cured loin. En: 12<sup>th</sup> international drying symposium. Noordwijkerhout, the Netherland. N.º 320.
- GLASS, K.A. Y JOHNSON, E.A. 2002. Formulating low-acid foods for botulinal safety. En: Juneja, V.K. y Sofos, J.N. eds. Control of Foodborne Microorganisms. New York, Marcel Dekker. 323-350.
- GOMBAS, D.E., CHEN, Y., CLAVERO, R.S., SCOTT, V.N. 2003. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J. Food Protect.* 66, 559-569.
- GÓMEZ, R., CARMONA, M.A. Y FERNÁNDEZ-SALGUERO, J. 1991. Estudio de los alimentos de humedad intermedia españoles. Actividad de agua y pH. En: II Jornadas científicas sobre "Alimentación Española", Granada.
- GONZÁLEZ, B. Y DÍEZ, V. 2002. The effect of nitrite and starter culture on microbiological quality of "chorizo" a Spanish dry cured sausage. *Meat Science* 60, 295-298.
- GONZÁLEZ-FANDOS, M.E., SIERRA, M. GARCÍA-LÓPEZ, M.L., GARCÍA-FERNÁNDEZ, M.C. Y OTERO, A. 1999. The influence of manufacturing and drying conditions on the survival and toxinogenesis of *Staphylococcus aureus* in two Spanish dry sausages (chorizo y salchichón). *Meat Science*, 52, 411-419.
- GORDO GÓMEZ, PABLO. 2003. Informe sobre la situación económica de la Industria Alimentaria en Castilla y León. Dirección General de Industrialización y Modernización Agraria. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León.
- GORDO GÓMEZ, PABLO. 2004. Estructura industrial alimentaria de Castilla y León. Dirección General de Industrialización y Modernización Agraria. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León.
- GORMLEY, F.J., LITTLE, C.L., GRANT, K.A., DE PINNA, E. Y MCLAUCHLIN, J. 2010. The microbiological safety of ready-to-eat specialty meats from markets

- and specialty food shops: A UK wide study with a focus on *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 27, 243-249.
- GRAU, F.H. Y VANDERLINDE, P.B. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef. *J. Food Protect.* 53, 739-741, 746.
- GRISENTI., M.S., LORI, D., VICINI, L., BOVIS, N., PEDRELLI, T. Y BARBUTI, S. 2004. Comportamento di *Listeria monocytogenes* in prosciutto crudo stagionato in rapporto all'atmosfera di confezionamento ed alla temperatura di conservazione. *Industria Conserve* 79, 3.
- GUÀRDIA, M.D., GUERRERO, L., GELABERT, J., GOY, P. Y ARNAU, J. 2006. Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Science* 73, 484-490.
- GUEST EDITORIAL. 2005. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: The need for clarification. *The Veterinary Journal* 170, 275-277.
- GUNNISON, J.B., CUMMINGS, J.R. Y MEYER, K.F. 1935. *Clostridium botulinum* type E. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 35, 278-280.
- GUPTA, A., SUMMER, C.J., CASTOR, M., MASLANKA, S Y SOBEL, J. 2005. Adult botulism type F in the United States, 1981-2002. *Neurology* 65, 1694-1700.
- GUTIÉRREZ, E., DOMÍNGUEZ, M.C. Y ZUMALACÁRREGUI, J.M. 1988. Chemical characteristics of dried beef "cecina" manufactured in the province of León (Spain). *Anales de la Facultad de Veterinaria de León* 34, 111-118.
- HALL, L.L., BICKNELL, G.R., PRIMROSE, L., PRINGLE, J.H., SHAW, J.A. Y FURNESS, P.N. 1998. Reproducibility in the quantification of mRNA levels by RT-PCR-ELISA and RT Competitive-PCR-ELISA. *BioTechniques* 24, 652-658.
- HAN, J. H. 2005. Innovations in Food Packaging. Han, J.H. ed. Holland, Elsevier, Ltd.
- HANSON, B.M., DRESSLER, A.E., HARPER, A.L., SCHEIBEL, R.P., WARDYN, S.E., ROBERTS, L.K., KROEGER, J.S. Y SMITH, T.C. 2011. Prevalence of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on retail meat in Iowa. *J. of Inf. And Public Health* 4, 169-174.
- HARRIGAN, W.F. Y MCCANCE, M.F Eds. 1976. Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press.
- HATHEWAY, C.L. 1992. *Clostridium botulinum* and other clostridia that produce botulinum neurotoxin. *En: Hauschild, A.H.W. y Dodds, K.L. eds. Clostridium botulinum, Ecology and Control in Foods.* New York, Marcel Dekker, 3-20.

- HATHEWAY, C.L. 1995. Botulism: the present status of the disease. *En: Montecuccos, C. ed. Clostridial Neurotoxins. Curr. Top. Microbiol. Immunol. Vol. 195. New York, Springer, 55-75.*
- HAUSCHILD, A.H.W. 1989. *Clostridium botulinum*. *En: Doyle, M.P. ed. Foodborne Bacterial Pathogens. New York, Marcel Dekker. 111-189.*
- HAUSCHILD, A.H.W. 1993. Epidemiology of human foodborne botulism. *En: Hauschild, A.H.W. and Dodds, K.L. eds. Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods. New York, Marcel Dekker. 69-104.*
- HAYWARD-LESTER, A., CHILTON, B.S., UNDERHILL, P.A. OEFNER, P.J. Y DORIS, P.A. 1998. Quantification of specific nucleic acids, regulated RNA processing and genomic polymorphisms using reverse-phase HPLC, en F. Ferré (Ed.), Gene Quantification. Birkhäuser, Boston. 45-78.
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., Loening, S.A. 1997. Betaine improves the PCR amplification of GC- rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res. 25 (19), 3957-3958.*
- HERRINGTON, C.S., DE ANGELIS, M., EVANS, M.F., TRONCONE, G. Y McGEE, J.O'D. 1992. Detection of high risk human papilloma virus in routine cervical smears: strategy for screening. *J. Clin. Pathol. 45, 385-390.*
- HIELM, S., HYYTIÄ, E., RIDELL, J. Y KORKEALA, H. 1996. Detection of *Clostridium botulinum* in fish and environmental samples using polymerase chain reaction. *Int. J. Microbiol. 31. 357-365.*
- HIELM, S., BJÖRKROTH, J., HYYTIÄ, E. ET AL. 1998. Prevalence of *Clostridium botulinum* in Finnish trout farms: pulsed-field gel electrophoresis typing reveals extensive genetic diversity among type E isolates. *Appl. Environ. Microbiol. 64, 4161-4167.*
- HIELM, S. 1999. Molecular detection, typing and epidemiology of *Clostridium botulinum*. Helsinki: University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Academic disertation. Disponible en: <http://www.doria.fi/bitstream/handle/10024/728/molecula.pdf?sequence=2>  
Fecha acceso: 10-03-2011
- HIGUCHI, R. FOCKLER, C., DOLLINGER, G. Y WATSON, R. 1993. Kinetic PCR analysis: Real-Time monitoring of DNA amplification reaction. *BioTechnology. 11, 1026-1030.*

- HOBBS, G., CROWTHER, J.S. Y NEAVES, P. 1982. Detection and isolation of *Clostridium botulinum*. En: Corry, J.E.L., Roberts, D. and Skinner, F.A. eds. Isolation and identification methods for food poisoning organisms. Academic Press, London, 151-164.
- HOGG, G., TAN, A. Y CUSACK, B. 2003. Home Delivery Project Report. Disponible en:  
[http://www.health.vic.gov.au/foodsafety/downloads/home\\_delivery\\_project\\_rep.pdf](http://www.health.vic.gov.au/foodsafety/downloads/home_delivery_project_rep.pdf). Fechas acceso: 8-09-2008.
- HOLLEY, 1981. Review of the potential hazard from botulism in cured meat. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 14, 183-195.
- HOLMBERG, S.D. AND BLAKE, P.A. 1984. Staphylococcal food poisoning in the United States. New facts and old misconceptions. *JAMA* 251:487-489.
- HOLT, J.G. ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 1st edition. Vol. 2 Gram-positive Bacteria other than *Actinomycetes*. Chapter 138. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Houben, J.H. Y VAN'T HOOFT, B.J. 2004. Variations in product-related parameters during the standardised manufacture of a semi-dry fermented sausage. *Meat Science* 69, 283-287.
- HOZ, L., D'ARRIGO, M., CAMBERO, I. Y ORDÓÑEZ, J.A. 2004. Development o fan *n*-3 fatty acid and  $\alpha$ -tocopherol enriched dry fermented sausage.
- HUONG, B.T.M, MAHMUD, Z.H., NEOGI, S.B., KASSU, A., NHIEN, N.V., MOHAMMAD, A., YAMATO, M., OTA, F., LAM, N.T., DAO, H.T.A. AND KHAN, N.C. 2010. Toxigenicity and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* isolated from Vietnamese ready-to-eat foods. *Food Control*, 21, 166-171.
- HUDSON, J.H., MOTT, S.J. Y PENNEY, N. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced roast beef. *J. Food Protect.* 57, 204-208.
- HUTSON, R.A, THOMPSON, D.E., LAWSON, P.A., SCHOCKEN-ITTURINO, R.P., BÖTTGER, E.C. Y COLLINS, M.D. 1993. Genetic interrelationships of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B y F and other members of the *Clostridium botulinum* complex as revealed by small-subunit rRNA sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 64, 273-283.



- HYUN-JOONG KIM, SI-HONG PARK, TAE-HO LEE, BAEK-HIE NAHM, YOUNG-ROK KIM, HAE-YEONG KIM. Microarray detectin of food-borne pathogens using specific probes prepared by comparative genomics. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 238-246.
- HYTTIÄ, E., EEROLA, S., HIELM, S. Y KORKEALA, H. 1997. Sodium nitrite and potassium nitrate in control of nonproteolytic *Clostridium botulinum* outgrowth and toxigenesis in vacuum-packed cold-smoked rainbow trout. *Int. J. Food. Microbiol.* 37, 63-72.
- HYTTIÄ, E., HIELM, S. MOKKILA, M., KINNUNEN, A. Y KORKEALA, H. 1999. Predicted and observed growth and toxicogenesis by *Clostridium botulinum* type E in vacuum-packaged fishery product challenge tests. *Int. J. Food Microbiol.* 47, 161-169.
- IARC. International Agency for Research on Cancer. 1978. Some N-nitroso compounds IARC monographs on the evaluation of risks to humans. Vol. 17. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol17/volume17.pdf>  
Fecha acceso: 18-10-2011.
- ICMSF. 1983. Microorganismos de los alimentos 1: Técnicas de análisis microbiológicos. Ed. Acribia. Zaragoza.
- ICMSF. 1996a. Microorganisms in foods Vol. 5. Microbiological specifications of food pathogens. En: Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C. y Tompkin, R.B. Blackie Academic & Professional, London, 141-182.
- ICMSF. 1996b. Microorganisms in foods Vol. 5. Characteristics of microbial pathogens. London: Blackie Academic & Professional.
- ICMSF, 2000. Microorganismos de los alimentos 1. Su significado y métodos de enumeración. Acribia, Zaragoza. 3-14.
- ICMSF. 2003. Microorganisms in foods Vol. 5. Microbial specifications of food pathogens. ICMSF.Kluwer Academic / Plenum Publishers, U.K.
- IDSA. 2009. Botulism: current, comprehensive information on pathogenesis, microbiology, epidemiology, diagnosis and treatment. Disponible en: <http://www.cidrap.umn.edu/idsa/bt/botulism/biofacts/botulismfactsheet.html>.  
Fecha acceso: 29-10-2010.
- IFT: Institute of Food Technologist, Dept. of Science and Technology Projects. 2000. Special supplement: Kintetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Barach, J.T., Barbosa-Canovas, G.V., Busta, F.F.,

- Datta, A.K., Davidson, P.M., Farkas, D.F., Heldman, D.R., Hoover, D.G., Kokini, J.L., Pflug, I.J., Pierson, M.D., Sastry, S.K., Schaffner, D.W., Zhang, Q.H. eds. *Journal of Food Science* 35, 108.
- INGHAM, S.C., ENGEL, R.A., FANSLAU, M.A., SHOLELLER, E.L., SEARLS, G. BUEGE, D.R. Y ZHU, J. 2005. Fate of *Staphylococcus aureus* on Vacuum-Packaged Ready-to-Eat Meat Products Stored at 21°C. *J. of Food Protect.* 68, 1911-1915.
- INE. 2010. Encuesta industrial de productos. Disponible en: <http://www.ine.es/daco/daco42/encindpr/secacti10.pdf> Fecha acceso: 24-04-2012.
- Jay, J.M. 2002. Microbiología moderna de los alimentos. Editorial Acribia. 415-429.
- JAY, J.M. 2002. A review of aerobic and psychrotrophic plate count procedures for fresh meat and poultry products. *J. Food Proct.* 65, 120-1206.
- JABLONSKI, L.M. Y BOACH, G.A. 1997. *Staphylococcus aureus*. In M.P. Doyle, L.R. Beuchat & T.J. Montville Eds. Food microbiology: Fundamentals and frontiers, 353-375. Washington: ASM Press.
- JONES, D. 1988. The place of Listeria among gram-positive bacteria. *Infection* 16, 85-88.
- JOHNSON, E.A. 2000. Neurotoxicogenic Clostridia. *En: Fischetti, V.A. et al., eds., Gram-Positive Pathogens.* Washington D.C., American Society for Microbiology. 540-550.
- JOHNSON, E.A. 2005a. Clostridial neurotoxins. *En: Dürre P. Ed. Handbook of Clostridia.* Boca Ratón, Florida, CRC Press.
- JOHNSON, E.A. 2005b. *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*. *En: Murray, P. ed. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, 8<sup>th</sup> ed.* London, UK, Hodder Arnold. 1035-1088.
- JOHNSON. E.A. 2007. *Clostridium botulinum*. *En: Doyle, M.P. and Beuchat, L.R. eds. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, 3<sup>rd</sup> ed.* Washington, D.C. ASM Press. 401-421.
- JOHNSON, E.A. Y MONTECUCCO, C. 2008. Botulism. *En: Engel, A.G. ed. Handbook of Clinical Neurology vol. 91 Neuromuscular junction disorders.* Elsevier B.V. 333-368.

- JOHNSON, E.A., SAN, P. Y FINEGOLD, M. 2007. *Clostridium*. En: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. y Pfaller, M.A. Eds. Manual of Clinical Microbiology, 9<sup>th</sup> ed. Washington D.C. ASM Press. 889-910.
- JUHASZ, A., RAVI, S., O'CONNELL, C.D. 1996. Sensitivity of tyrosinase mRNA detection by RT-PCR: rTth DNA polymerase vs. MMLV-RT and AmpliTaq polymerase. *Biotechniques*, 20, 592-600.
- JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN. 2011a. Libro Blanco de las TIC en el Sector Agroalimentario. Subsector Cárnico. Ed. Junta de Castilla y León y Fundetec. Burgos.
- JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN. 2011b. Disponible en: <https://www.tramitacastillayleon.jcyl.es> Fecha de acceso: 23-05-2012.
- KAINZ, P. 2000. The PCR plateau phase – towards an understanding of its limitations. *Biochim. Biophys. Acta*. 1494, 23-27.
- KAUTTER, D.A. 1964. *Clostridium botulinum* type E in smoked fish. *Food Res.* 29, 843-849.
- KHANNA, M., CAO, W., ZIRVI, M., PATY, P. Y BARANY, F. 1999. Ligase detection reaction for identification of low abundance mutations. *Clin. Biochem.* 32, 287-290.
- KIM, C.-H., KHANT, M., MORIN, D.E., HURLEY, W.L., TRIPATHY, D.N., KEHRLI, M.Jr., OLUOCH, A.O. Y KAKOMA, I. 2001. Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus* nuc gene in bovine milk. *J. Dairy. Sci.* 84, 74-83.
- KLEPPE, K., OHTSUKA, E., KLEPPE, R., MOLINEUX, I. AND KHORANA, H.G. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Molec. Bio.* Vol. 56, 341-361.
- KHAN, G., KANGRO, H.O., COATES, P.J. Y HEATH, R.B. 1991. Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J. Clin. Pathol.* 44, 360-365.
- KHORANA, H.G., AGARWAL, K.L., BESMER, P., BUCHI, H., CARUTHERS, M.H., CASHION, P.J., FRIDKIN, M., JAY, E., KLEPPE, K., KLEPPE, R., KUMAR, A., LOEWEN, P.C., MILLER, R.C., MINAMOTO, K., PANET, A., RAHBHANDARY, U.L., RAMOMOORTHY, B., SEKIYA, T., TAKEYA, T. Y VAN DE SANDE, J.H. Total synthesis of the structural gene for the precursor of a tyrosine suppressor

- transfer RNA from *Escherichia coli*. General introduction. *J. Biol. Chem.* Vol 251, 565-570.
- KLIJN, N., NIEUWENHOF, F.J., HOOLWERF, J.D., VAN DER WAALS, C.B. AND WEERKAMP, A.H. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* pp. 2919-2924.
- KLOOS, W.E. Y LAMBE, W. 1991. *Staphylococcus*. En: Balows ed. Manual of clinical microbiology 5<sup>TH</sup> ed. Washintong D.C., ASM, 227-229.
- KLOOS, W.E., SCHELEIFER, K. Y GÖTZ, F. 1992. The genus *Staphylococcus*. En: The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria. Vol. II" 2<sup>a</sup> ed. Pp. 1639-1420. Eds. Balowos, H.G., Trüper M., Dworkin, W., Harder, W. y Schleifer, K. Springer-Verlag, New York.
- KRAMER, F.R. Y LIZAIRDI, P.M. 1989. Replicable RNA reporters. *Nature* 339, 401-402.
- KUEPER, T.V. Y TRELEASE, R.D. 1974. Variables affecting botulinum toxin development and nitrosamine formation in fermented sausages. *Proceedings of the Meat Industry Conference*, American Meat Institute Foundation, Washington D.C. 69-74.
- LAACK, R.L.J.M. VAN, JOHNSON, J.L., VAN DER PALEN, C.J.N.M., SMULDERS, F.J.M. Y SNIJDERS, J.M.A. 1993. Survival of pathogenic bacteria on pork loins as influenced by hot processing and packaging. *J. Food Protect.* 56, 847-851, 873.
- LAFARGA, A., TIRADO, C., PINILLA, M.J., BLASCO, M.D. Y NAVARRO, M.D. 1986. Estudio microbiológico e embutidos cárnicos frescos. Proceedings of the 5th Meeting of the Spanish Food Microbiology Society. Zaragoza. Spain. 87-88.
- LALEYE, L.C., LEE, B.H., SIMARD, R.E., CARMICHAEL, L. Y HOLLEY, R.A. 1984. Shelf life of vacuum-or nitrogen-packed Pastrami: Effects of packaging atmospheres, temperatura and duration of storage on physicochemical and sensory changes. *J. Food Science*, 832-837.
- LANCETTE, G.A. Y BENNETT, R.W. 2001. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. En: Downes y Ito eds. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4<sup>th</sup> ed. Washington D.C., American Public Health Association (APHA).

- LANE, D J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M., editors; Stackebrandt E, Goodfellow M., editors. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester, United Kingdom: John Wiley & Sons; 115–175.
- LANGOWSKI, H.-C. 2010. Innovative packaging and solutions for meat and meat products. Disponible en: <http://www.thedairysite.com/processing/articles/896/innovative-packaging-solutions-for-meat-and-meat-products> Fecha acceso: 21-11-2009.
- LANTZ, P.-G., MATSSON, M., WADSTRÖM, T. Y RÅDSTROM, P. 1997. Removal of PCR inhibitors from human faecal samples through the use of an aqueous two-phase system for simple preparation prior to PCR. *J. Microbiol. Meth.* 28, 159-167.
- LARA, J.A.F., SENIGALIA, S.W.B., OLIVEIRA, T.C.R.M., DUTRA, I.S., PINTO, M.F. Y SHIMIKOMAKI, M. 2003. Evaluation of survival of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum* in charqui meats. *Meat Science* 65, 609-613.
- LAWYER, F, STOFFER, S., SAIKI, R., CHANG, S., LANDRE, P., ABRAMSON, R. AND GELFAND, D. 1993. High-level expression, purification and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *PCR Methods and Applications*, 2, 275-287.
- LE BOURHIS, A.-G., SAUNIER, K., DORÉ, J., CARLIER, J.-P., CHAMBA, J.-F., POPOFF, M.-R. Y THOLOZAN, J.-L. 2005. Development and validation of PCR primers to assess the diversity of *Clostridium* spp. in cheese by temporal temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, pp. 29-38.
- LE BOURHIS, A.G., DORÉ, J., CARLIER, J.-P., CHAMBA, J.-F., POPOFF, M.-R. Y THOLOZAN, J.-L. 2007. Contribution of *C. beijerinckii* and *C. sporogenes* in association with *C. tyrobutyricum* to the butyric fermentation in Emmental type cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 113, 154-163.
- LE LOIR, Y., BARON, F. Y GAUTIER, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Gent. Mol. Res.* 2, 63-76.
- LE MINOR, L. 1992. Le genus *Salmonella*. En: The prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications. Vol. III.

- 2<sup>a</sup> ed. Eds. Balows, A. Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. y Schleifer, K. Springer-Verlag, New York. 2761-2774.
- LE MONNIER, A, Y LECLERCK, A. 2008. *Listeria* et Listériose: des animaux d'élevage à nos assiettes. *J. Pathologie Biologie* 26.
- LEHMAN, I.R., BESSMAN, M.J., SIMMS, E.S. AND KORNBERG, A. 1958. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid. Preparation of Substrates and Partial Purification of an Enzyme from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* vol. 233, 163-170.
- LEISTNER, L. 1995. Stable and safe sausages world-wide. *En: Campbell-Platt, G. y Cook, P.E. Eds. Fermented Meats.* Glasgow, Black Academia & Professional. 160-175.
- LEVINE, P., ROSE, B., GREEN, S., RANSOM, G. Y HILL, W. 2001. Pathogen testing of ready-to-eat meal and poultry products collected at federally inspected establishments in the United States, 1990-1999. *J. Food Protect.* 64, 1188-1193.
- LEUCHS, J. 1910. Beitrage zur Kenntnis des Toxins und Antitoxins des *Bacillus botulinus*. *Ztschr. Hyg. Infektskh.* 65, 55-84.
- LILLY Jr. T., SOLOMON, H.M. Y RHODEHAMEL, E.J. 1996. Incidente of *Clostridium botulinum* in vegetables packaged under vacuum or modified atmosphere. *J. of Food Protect.* 59, 59-61.
- LINA, G., BOHACH, G.A., NAIR, S.P., HIRAMATSU, K., JOUVIN-MARCHE, E. AND MARIUZZA, R. 2004. Standard nomenclature for the superantigens expressed by *Staphylococcus*. *J. Infect. Dis.* 189: 2334-2336.
- LINDQVIST, R Y WESTÖÖ, A. 2000. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravid salmon and rainbow trout in Sweden. *Int. J. Food Microbiol.* 58, 181-196.
- LINDQVIST, R. Y LINDBLAD, M. 2009. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. *Int. J. of Food Microbiol.* 129, 59-67.
- LIZASO, G., CHASCO, J. Y BERIAIN, M.J. Microbiological and biochemical changes during ripening of salchichón, a Spanish dry cured sausages. *Food Microbiology* 16, 219-228.
- LÓPEZ, J.L. 1999. Calidad alimentaria. Riesgos y controles en la agroindustria. Ediciones Mundi-Prensa, Bilbao. 203-217.

- LONGLEY, M.J., BENNETT, S.E., MOSBAUGH, D.W. 1990. Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 18, 4193-4198.
- LORENZO, J.M., TEMPERÁN, S., BERMÚDEZ, R, COBAS, N. Y PURRIÑOS, L. 2011. Changes in physico-chemical, microbiological, textural an sensory attributes during ripening of dry-cured foal salchichón. *Meat Science* 90, 194-198.
- LU, W-YW. 2006. Effects of intrinsic and extrinsic factors of sporulation conditions on heat resistance of *Clostridium sporogenes* PA 3679 spores. (MSc Thesis). Pullman, Wash.: Washington State Univ.
- LÜCKE, F.-K., HECHELMANN, H. Y LEISTNER, L. 1982. Botulismus nach Verzehr von Rohschinken – Experimentelle Untersuchungen. *Fleischwirtschaft* 62, 203-206.
- LÜCKE, F.-K., HECHELMANN, H. Y LEISTNER, L. 1983. Fate of *Clostridium botulinum* in fermented sausages processed with or without nitrite. *Proceedings of the 29<sup>th</sup> European Meeting of Meat Research Workers*, Parma, Italy. 403-409.
- LÜCKE, F.K. 1985. Fermented sausages. En: B.J.B. Woods ed. *Microbiology of fermented foods*. Vol II. London: Elsevier. 41-83.
- LUND B.M. AND PECK M.W. 1994. Heat-resistance and recovery of non-proteolytic *Clostridium botulinum* in relation to refrigerated, processed foods with and extended shelf-life. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 115-128.
- LUND, B.M. Y PECK, M.W. 2000. *Clostridium botulinum*. En: Lund, B.M., Baird-Parker, A.C. y Gould, G.W. eds. *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Maryland, Aspen Publishers Inc. 1057-1109.
- LUNDBERG, K.S., SHOEMAKER, D.D., ADAMS, W.W., SHORT, J.M., SORGE, J.A., MATHUR, E.J. 1991. High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene*. 108, 1-6.
- LYBBY, S.J., HALSEY, T.A., ALTIER, C., POTTER, J. Y GYLES, C.L. 2004. Salmonella. En: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. eds. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publising Professional, Iowa, USA.
- LYYTIKÄINEN, O., KOORT, J., WARD, L., SCHILDT, R., RUUTU, P., JAPISSON, E., TIMONEN, M. Y SIITONEN, A. 2000. Molecular epidemiology of an outbreak

- caused by *Salmonella enterica* serovar Newport in Finland and the United Kingdom. *Epidemiol. Infect.* 124, 184-192.
- McMillin, K.W. 2008. Where es MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*, 80, 43-65.
- MAH, J-H., KANG, D-H. AND TANG, J. 2008. Effects of minerals on sporulation and heat resistance of *Clostridium sporogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 128, 385-389.
- MALEK, M., BARZILAY, E., KRAMER, A., CAMP, B., JAYKUS, L.A., ESCUDERO-ABARCA, B., DERRICK, G., WHITE, P., GERBA, C., HIGGINS, C., VINJE, J., GLASS, R., LYNCH, M. Y WIDDOWSON, M.A. 2009. Outbreak of norovirus infection among river rafters associated with packaged delicatessen meat, Grand Canyon, 2005. *Clin. Infect. Dis.* 48, 31-37.
- MALORNY, B., TASSIOS, P.T., RÅDSTRÖM, P., COOK, N., WAGNER, M. Y HOORFAR, J. 2003. Standarization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 83, 39-48.
- MARCO, A., NAVARRO, J.L. Y FLORES, M. 2006. The influence of nitrite and nitrate on microbial, chemical and sensory parameters of show dry fermented sausage. *Meat Science* 73, 660-673.
- MARCO, A., NAVARRO, J.L. Y FLORES, M. 2008. The sensory quality of dry fermented sausages as affected by fermentation stage and curing agents. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 449-458.
- MARCOS, B. 2007. Mejora de la seguridad alimentaria en productos cárnicos listos para el consumo mediante la aplicación combinada de tecnologías de conservación emergentes. Universidad de Gerona, Tesis Doctoral.
- MARSHALL, D.L., WIESSE-LEHIHG, P.L., WELLS, J.H. Y FARR, A.J. 1991. Comparative growth of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* on precooked chicken nuggets stored under modified atmospheres. *J. Food Protect.* 54, 841-843.
- MARTÍN, A., COLÍN, B., ARANDA, E., BENITO, M.J., Y CÓRDOBA, M.G. 2007. Characterization of *Micrococcaceae* isolated from Iberian dry-cured sausages. *Meat Science* 75, 696-708.
- MARTÍN, A., BENITO, M.J., HERNÁNDEZ, A., PÉREZ-NEVADO, F., CÓRDOBA, J.J. Y CÓRDOBA, M.G. 2008. Characterisation of microbial deep spoilage in Iberian dry-cured ham. *Meat Science* 78, 475-848.



- MARTÍN, S.E. Y MYERS, E.R. 1994. *Staphylococcus aureus*. En: "Foodborne disease handbook. Diseases caused by bacteria". Vol.1. pp. 345-394. Eds. Hui, Y.H., Gorham, J.R., Murrell, K.D. y Cliver, D.O. Marcel Dekker, New York.
- MARTÍNEZ. E.J., RODRÍGUEZ, J., SOTO, T. Y MARTÍNEZ, A. 1982. Estudio comparativo de la microflora presente en embutidos fermentados. *Anales de Bromatología*, 34, 259-268.
- MARTÍNEZ. E.J., RODRÍGUEZ, J., SOTO, T. & MARTÍNEZ, A. 1984. Localización de microorganismos en embutidos fermentados. *Anales de Microbiología*, 36, 295-300.
- MATEO, J. 1994. El chorizo artesanal de la provincia de León (cuestionario). *Alimentaria* Jul-Ago, 19-23.
- MEAD, P.S., SLUTSKER, L., DIETZ, V., MCCRAIG, L.F., BRESEE, S., SHAPIRO, C., GRIFFIN, P.M. Y TAUXE, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 5, 607-625.
- MEAD, P.S., DUNNE, E.F., GRAVES, L., WIEDMANN, M., PATRICK, M., HUNTER, S., SALEHI, E., MOSTASHARI, F., CRAIG, A., MSHAR, P., BANNERMAN, T., SAUDERS, B.D., HAYES, P., DENITT, W., SPARLING, P., GRIFFIN, P., MORSE, D., SLUTSKER, L. AND SWAMINATHAN, B. 2006. Nation outbreak of listeriosis due to contaminated meat. *Epidemiology and Infection* 134, 744-751.
- MEBUS, C., ARIAS, M., PINEDA, J.M., TAPIADOR, J., HOUSE, C. Y SANCHEZ-VIZCAINO, J.M. 1993. Survival of several porcine viruses in different Spanish dry-cured meat products. *Food Chemistry* 59, 555-559.
- MÉNDEZ-ÁLVAREZ, S. Y PÉREZ-ROTH, E. 2004. La PCR multiple en microbiología clínica. *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* 22, 183-192.
- MENG, J. AND GENIGEORGIS, C.A. 1993. Modelling lag phase of non-proteolytic *Clostridium botulinum* toxigenesis in cooked turkey and chicken breast as affected by temperature, sodium lactate, sodium chloride and spore inoculum. *Int. J. Food Microbiol.* 19, 109-122.
- METAXOPOULOS, J., GENIGEORGIS, C. FANELLI, M.J., FRANTI, E. Y COSMA, E. 1981a. Production of Italian dry salami. I. Initiation of staphylococcal growth in salami under comercial manufacturing conditions. *J. Food Protect.* 44, 347-352.
- METAXOPOULOS, J., GENIGEORGIS, C. FANELLI, M.J., FRANTI, E. Y COSMA, E. 1981b. Production of italian dry salami II: effect of starter culture and chemical

- acidulation on staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 863-871.
- METZGER-BODDIEN, C., BOSTEL, A. Y KEHLE, J. 2004. AnDia TEC Salmonella spp. PCR-ELISA for analysis of food samples. *J. Food Proect.* 67, 1585-1590.
- MEYER, K. F. 1956. The status of botulism as a world health problem. Bull. W.H.O. 15, 281-298.
- MEYER, K.F. Y EDDIE, B. 1950. Fifty Years of Botulism in the United Status and Canada. George Willians Hooper Foundation, San Francisco, California.
- MHAMBI, S. 2008. Presence of *Staphylococcus aureus* associated with South African biltong at point of sale. Thesis BSc (Hons), University of the Witwatersrand, Johannesburg, South Africa.
- MICHENER, H.D. Y ELLIOTT, R.P. 1965. Factors affecting the growth of psychrophilic microorganisms in foods – a review. Tech. Bull. 1320, U.S. Dep.. Agric. Albano, CA.
- MOLINERO, C., RUBIO, B., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ C., MARTÍNEZ, B. Y GARCÍA-CACHAN, M.D. 2004. Influence of anatomical origin of raw meat on the sensory and chemical characteistic of dried beef “Cecina de León”. In: 50<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, August, Helsinki, Finland. 902-905.
- MOLINERO, C., RUBIO, B., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., MARTÍNEZ, B. Y GARCÍA-CACHÁN, M.D. 2004. Influence of anatomical origin of raw meat on the sensory and chemical characteristic of dried beef “Cecina de León”. 50<sup>th</sup> International Congress of Meat Science and Technology, Helsinki, Finland.
- MONTECUCCO, C. Y SCHIAVO, G. 1994. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* 13, 1-8.
- MONTEIRO, L., BONNEMAISON, D., VEKRIS, A., PETRY, K.G., BONNET, J., VIDAL, RI., CABRITA, J. Y MÉGRAUD, F. 1997. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 35, 995-998.
- MORRISON, C. Y GANNON, F. The impact of the PCR plateau phase on quantitative PCR. *Biochim. Biophys. Acta.* 1219, 493-498.
- MOSSEL, D.A.A. Y DEWAART, J. 1968. The enumeration of clostridia in foods and feeds. *Ann. Inst. Past.* Lille 19, 13-27.
- MOSSEL, D.A.A. 1985. Media for Enterobacteriaceae. *Int. J. Food Microbiol.* 2, 27.

- MOSSEL, D.A.A. AND MORENO, B. 1985. Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos. 1st. Acribia, S.A. Zaragoza.
- MOSSEL, D.A.A., MORENO, B., STRUIJKC, C.B. 2003. Microbiología de los alimentos. 2ª ed. Acribia, S.A. Zaragoza.
- MØLLER, W Y SCHEIBEL, I. 1960. Preliminary report on the isolation of an apparently new type of *Cl. Botulinum*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 48, 80.
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHAT, S., SAIKI, R., HORN, G. AND ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263-273.
- MULLIS, K.B. Y FALOONA, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, vol. 155, 335-350.
- MULLIS, K. 1993. Nobel Lecture. Disponible en:  
[http://nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html](http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/mullis-lecture.html)  
 Fecha acceso: 17-06-2010.
- MUNSON, S.H., TREMAINE, M.T., BETLEY, M.J. Y WELCH, R.A. 1998. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 66: 3337-3348.
- MURRAY, E.G.D., WEBB, R.E. Y SWANN, M.B.R. 1926. A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes*. *J. Pathol. Bacteriol.* 29, 407-439.
- MYERS, T.W. Y GELFAND, D.H. 1991. Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry*, 30, 7661-7666.
- NACIÓN, LA. 2009. Detectan *Listeria* en cecinas marca Jumbo. Disponible en:  
[http://lanacion.cl/prontus\\_noticias\\_v2/site/artic/20090424/pags/20090424214102.html](http://lanacion.cl/prontus_noticias_v2/site/artic/20090424/pags/20090424214102.html). Fecha acceso: 25-10-2010.
- NAIDOO, K. Y LINDSAY, D. 2010. Survival of *Listeria monocytogenes*, and enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pasteurii*, during two types of biltong-manufacturing processes. *Food Control* 21, 1042-1050.

- NEGHINA, A.M., MARINCU, I., MOLDOVAN, R., IACOBICIU, I. Y NEGHINA, R. 2010. Foodborne botulism in southwest Romania during the post-communism period 1990-2007. *Int. J. Infec. Disea.* 14, e96-e101.
- NIETO-LOZANO, J.C., REGUERA-USEROS, J.I., PELÁEZ-MARTÍNEZ, M.C., SACRISTÁN-PÉREZ-MINAYO, G., GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, A.J. Y HARDISSON DE LA TORRE, A. 2010. The effect of the pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spanish dry-fermented sausages and frankfurters. *Food Control* 21, 679-685.
- NOLAN, D.A., CHAMBIN, D.C. Y TROLLER, J.A. 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Int. J. of Food Microbiol.* 16, 323-335.
- NORDAL, J. Y GUDDING, R. 1975. The inhibition of *Clostridium botulinum* type B and E in salami sausage. *Acta Veterinaria Scandinavica* 16, 537-548.
- NOTERMANS, S. Y HEUVELMAN, C.J. 1983. Combined effect of water activity, pH and suboptimal temperature on growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.* 48, 1832-1840.
- NOTERMANS, S., VELD, P., WIJZES, T. Y MEAD, G.C. 1993. A user's guide to microbiological challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. *Food Microbiol.* 10, 145-157.
- NOTERMANS, S., VELD, P. 1994. Microbiological challenge testing for ensuring safety of food products. *Int. J. Food Microbiol.* 24, 33-39.
- NOTERMANS, S., DUFRENNE, J., TEUNIS, P. Y CHACKRABORTY, T. 1998. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 61, 244-248.
- NOVICK, R.P. 1993. *Staphylococcus aureus*. In: A.L. Sonenshein, J.A. Hoch & R. Losick Eds. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics, 15-33. Washington DC: American Society for Microbiology.
- NUMMER, B.A., HARRISON, J.A., HARRISON, M.A., KENDALL, P., SOFOS, J.N. Y ANDRESS, E.L. 2004. Review: Effects of preparation methods on the microbiological safety of home-dried meat jerky. *J. Food Protect.* 67 (10), 2337-2341.

- NUOVO, G.J., GALLERY, F., MacCONNEL, P., BECKER, J. Y BLOCH, W. 1991b. An Improved Technique for the *In Situ* Detection of DNA After Polymerase Chain Reaction Amplification. *Am. J. of Pathology* vol. 139, 6, 1239-1244.
- NUOVO, G.J. 2003. *In situ* amplification of cDNA. hybridizations. En PCR Technology: Current innovations. Eds. Weissensteiner, Griffin, H.G & Griffin, A. CRC Press.
- OIE Manual of diagnostic Tests and vaccines for terrestrial animals. 2004. Validation and quality control of Polymerase Chain Reaction methods used for the diagnosis of infectious diseases. Office International Des. Epizooties, Chapter 1.1.4, 1-10.
- OLMOS, A., ESTEBAN, O., BERTOLINI, E. Y CAMBRA, M. 2003. Nested PCR in a Single Closed Tube. En Barlett J.M.S. and Stirling D. eds. PCR Protocols. Humana Press, Totowa, New Jersey. 151-160.
- OU, C.YL, MOORE, J.J., AND SCHOCHETMAN, G. 1991. Use of UV irradiation to reduce false positivity in the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 10, 442-446.
- OSORIO, M.T., CABEZA, E., ZUMALACÁRREGUI, J.M., CASTRO, S. Y MATEO, J. 2004. Aportaciones a la caracterización del chorizo elaborado en la provincia de Zamora. *Eurocarne* 125, 151-158.
- PAL, A., LABUZA, T.P., DÍEZ-GONZÁLEZ, F. 2008. Shelf life evaluation for ready-to-eat sliced uncured turkey breast and cured ham under probable storage conditions based on *Listeria monocytogenes* and psychrotroph growth. *Int. J. Food Microbiol.* 126, 49-56.
- PANET, A. Y KHORANA, H.G. 1974. Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribonucleic templates to cellulose and its use in their replication. *J. Biol. Chem.* 249, 5213-5221.
- PANIKER, G., CALL, D.R., KRUG, M.J., BEJ, A.K. 2004. Detection of pathogenic *Vibrio spp.* in shellfish by using multiplex PCR and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7436-7444.
- PARRA, V., VIGUERA, J., SÁNCHEZ, J., PEINADO, J., ESPÁRRAGO, F., GUTIÉRREZ, J.I. Y ANDRÉS, A.I. 2010. Modified atmosphere packaging and vacuum packaging for long period chilled storage of dry-cured Iberian ham. *Meat Science*, 760-768.

- PASCUAL, M.R. 1989. Microbiología alimentaria: Detección de bacterias con significado higiénico-sanitario. Ed. Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud "Carlos III". Madrid.
- PECK, M.W., GRANUM, P.E., GOULD, G.W. AND MAINIL J.G. eds. 2004. Booklet 4. Foodborne clostridia and sporulation. *En: Concerted Action QLK2-CT2001-01267, Genus Clostridium.* [www.genusclostridium.net](http://www.genusclostridium.net)
- PECK, M.W., STRINGER, S.C. Y CARTER, A.T. 2011. *Clostridium botulinum* in the post-genomic era. *Food Microbiology* 28, 183-191.
- PECORARO, S., TATZEL, R. Y WALLNÖFER, P.R. 1999. Species-specific PCR from cells and spores: A rapid method for the identification of dairy-relevant Clostridia. *Adv. Food Sci.* 21, 210-216.
- PÉREZ, H., RUBIO, C., POZUELO, M.R., REVERT, C. Y HARDISSON, A. 2003. Botulismo y toxina botulínica. *Revista de Toxicología* 1, 8-12.
- PÉREZ, J., SPRINGHORPE, V.S., SATTAR, S.A. 2005. Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: relevance to environmental control. *Am. J. Infect. Control*, 33, nº 6, 320-325.
- PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A., SAYAS-BARBERÁ, M.E., FERNÁNDEZ LÓPEZ, J. Y ARANDA-CATALÁ, V. 1999. Physicochemical characteristics of Spanish-type dry-cured sausage. *Food Research Internacional* 32, 599-607.
- PETROVA-YANAKIEVA, L. Y GOGOV, J. 1999. A comparative study on three culture media for isolation and assessment of *Clostridium botulinum* in foodstuffs. Disponible en: AGRIS Centre, CSTEI of Bulgaria.
- PFEFFER, U., FECAROTTA, E. Y VIDALI, G. 1995. Efficient one-tube RT-PCR amplification of rare transcripts using short sequence-specific reverse transcription primers. *BioTechniques* 19, 204-206.
- PINTO, M.F., PONSANO, E.H.G., FRANCO, B.D.G. Y SHIMOKOMAKI, M. 1998. Controle de *Staphylococcus aureus* en charques (jerked beef) por culturas iniciadoras. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos*, 18, 200-204.
- PITT, M.L.M. Y LECLAIRE, R.D. 2005. Pathogenesis by aerosol. *En: Lindler, L.E., Lebeda, F.J. y Korch, G.W. eds. Biological Weapons Defense. Infectious Diseases and Counterbioterrorism.* Totowa, N.J., Humana Press. 65-78.
- PIVNICK, H. Y BIRD, H. 1965. Toxicogenesis by *Clostridium botulinum* types A and E in perishable cooked meats vacuum-packed in plastic pouches. *Food Technology*, July, 132-140.

- POMP, D. Y MEDRANO, J.F. 1991. Organic solvents as facilitators of polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 10, 58-59.
- PORTOCARRERO, S.M., NEWMAN, M. Y BENJY, M. 2001. Staphylococcus aureus survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. *Meat Science*, 62, 267-273.
- PORTOCARRERO, S.M., NEWMAN, M. Y MIKEL, B. 2002. Reduction of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* 0157:H7 during processing of country-cured hams. *Food Microbiol. and Safety*, 67, 1892-1898.
- PORTOCARRERO, S.M., MELISSA, N. Y MIKEL, B. 2002. *Staphylococcus aureus* survival, staphylococcal enterotoxin production and shelf stability of country-cured hams manufactured under different processing procedures. *Meat Science* 62, 267-273.
- POWELL, H.A., GOODING, C.M., GARRET, S.D., LUND, B.M. Y McKEE, R.A. 1994. Proteinase inhibition of the detection of *Listeria monocytogenes* in milk using the polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* 18, 59-61.
- PRENCIPE, V.A., RIZZI, V., ACCIARI, V., IANNETTI, L., GIOVANNINI, A., SERRAINO, A., CALDERONE, D., ROSSI, A., MORELLI, D., MARINO, L., MIGLIORATI, G. Y CAPORALE, V. 2012. *Listeria monocytogenes* prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain. *Food Control* 25, 150-158.
- PRÉVOT, A.R. 1953. Rapport d'introduction du président du sous-comite *Clostridium* pour l'unification de nomenclature des types toxigéniques de *C. botulinum*. *Int. Bull. Bact. Nomencl.* 3, 120-123.
- RAE. 1992. Diccionario de la Lengua Española. Vigésima primera edición. Tomo I. Espasa Calpe. 448.
- RÅMSTRÖM, P., KNUTSSON, R., WOLFFS, P., LÖVEKLEV, M. Y LÖFSTRÖM, C. 2004. Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. *Mol. Biotechnol.* 26, 133-146.
- RAO, S., STARR, R.L., MORRIS, M.G. Y LIN, W.J. 2007. Variations in expression and release of botulinum neurotoxin in *Clostridium botulinum* type A strains. *Foodborne Pathogens and Disease* 4, 201-207.

- RASSF. 2006. The Rapid Alert System for Food and Feed Annual Report 2005. Disponible en: [http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2005\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2005_en.pdf). Fecha acceso: 05-05-2010.
- REEVES, M.W., EVINS, G.M., HEIBA, A.A., PLIKAYTIS, B.D. Y FARMER, J.J. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* 27, 313-320.
- RHOADES, J.R., DUFFY, G. Y KOUTSOUMANIS, K. 2009. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review. *Food Microbiology* 26, 357-376.
- RIRIE, K.M., RASMUSSEN, R.P. Y WITTEWER, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245, 154-160.
- ROBERTSON, G.L. 2006. Food Packaging. Principles and Practice. CRC Press. Ed. Taylor & Francis.
- ROBLOT, P., ROBLOT, F., FAUCHÈRE, J.L., DEVILLEGER, A., MARÉCHAUD, R., BREUX, J.P., GROLLIER, G. Y BECQ-GIRAUDON, B. 1994. Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers, France. *J. Med. Microbiol.* 40, 379-384.
- ROCOURT, J Y COSSART, P. 1997. *Listeria monocytogenes*. En: "Food microbiology fundamentals and frontiers", pp. 337-352. Eds. M.P. Doyle, L.RI Beuchat y T.J. Montville. ASM, Washington, D.C.
- ROCOURT, J. 1999. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification, p. 1-20. In E. T. Ryser and E. H. Marth: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Dekker, New York.
- ROCOURT, J., BOERLI, P., GRIMONT, F., JACQUET, C. Y PIFFARETTI, J.C. 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 171-174.
- ROCOURT, J., JACQUET, C. AND REILLY, A. 1994. Epidémiologie des infections humaines à *Listeria monocytogenes* en 1994: certitudes et interrogations. *Ann. Inst. Pasteur* 5:168-174.



- RODGERS, S., KAILASAPATHY, K., COX, J. Y PEIRIS, P. 2004. Co-incubation of *Clostridium botulinum* with protective cultures. *Food Research International* 37, 659-666.
- RODRIGUEZ, I. P. Y BARRERA, H. A. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Ciencia UANL*. Vol. VII, n.º 3, 323-335.
- ROSEIRO, L.C., SANTOS, C., SOL, M., BORGES, M.J., ANJOS, M., GONÇALVES, H. Y CARVALHO, A.S. 2008. Proteolysis in *Painho de Portalegre* dry fermented sausage in relation to ripening time and salt content. *Meat Science* 79, 784-794.
- ROSER, E.T. Y MARTH, E.H. eds. 2007. *Listeria, listeriosis and food safety*, 3<sup>rd</sup> ed. CRC Press, Boca Raton (USA).
- ROSS, R.S., VIAZOV, S., SARR, S., HOFFMANN, S., KRAMER, A. Y ROGGENDORF, M. 2001. Quantitation of hepatitis C virus RNA by third generation branched DNA-based signal amplification assay. *J. Virol. Methods* 101, 159-168.
- RUBIO, B., MARTÍNEZ, B., GONZÁLEZ, C. Y GARCÍA, M.D. 2005. Estudio de la vida útil de la Cecina de León envasada con distintas atmósferas modificadas. Ed. Junta de Castilla y León.
- RUBIO, B., MARTINEZ, B., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, C., GARCÍA-CACHÁN, M.E., ROVIRA, J., Y JAIME, I. 2006. Influence of storage period and packaging method on sliced dry cured beef Cecina de León: effects on microbiological, physicochemical and sensory quality. *Meat Science*, 74, 710-717.
- RUBIO, B., MARTÍNEZ, B., SÁNCHEZ, M.J., GARCÍA-CACHÁN, M.D., ROVIRA, J. Y JAIME, I. 2007. Study of the shelf life of a dry fermented sausage "salchichón" made from raw material enriched in monounsaturated and polyunsaturated fatty acids and stored under modified atmospheres. *Meat Science* 76, 128-137.
- RUIZ, J., VENTANA, J., CAVA, R., TIMÓN, M.L. Y GARCÍA, C. 1998. Sensory characteristics of Iberian ham: Influence of processing time and slice location. *Food Research International* 31, 53-58.
- RUIZ-MOYANO, S., MARTÍN, A., BENITO, M. J., HERNÁNDEZ, A., CASQUETE, R. Y CÓRDOBA, M. G. 2011. Application of *Lactobacillus fermentum* HL57 and *Pediococcus acidilactici* SP979 as potencial probiotics in the manufacture of traditional Iberian dry-fermented sausages. *Food Microbiol.* 28, 839-847.

- RUIZ-RAMÍREZ, J., SERRA, X., ARNAU, J. Y GOU, P. 2005. Profiles of water content, water activity and texture in crusted dry-cured loin and in non-crusted dry-cured loin. *Meat Science* 69, 519-525.
- RUUSUNEN, M. Y PUOLANNE, E. 2005. Reducing sodium intake from meat products. *Meat Science* 70, 531-541.
- SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALON, F., MULLIS, K.B., HOM, G.T., ERLICH, H.A. Y ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for the diagnosis of sickle-cell anemia. *Science* 230, 1350-1354.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. AND ERLICH, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 2349, 487-491.
- SÁNCHEZ-MOLINERO, F, GARCÍA-REGUEIRO, J.A. Y ARNAU, J. 2010. Processing of dry-cured ham in a reduced-oxygen atmosphere: Effects on physicochemical and microbiological parameters and mite growth. *Meat Science*, 400-408.
- SANGER, F., NICKLEN, S. AND COULSON, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463-5467
- SAMESHIMA, T., MAGOME, C., TAKESHITA, K., ARIHARA, K., ITOH, M. AND KONDO, Y. 1998. Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behaviour of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.* 41, 1-7.
- SANZ, J.J. 2000. Tesis Doctoral: Estudio de las características microbiológicas y físico-químicas del chorizo de Cantimpalos en relación con su proceso de elaboración y maduración. Universidad de León.
- SANZ, J.J., SANTOS, J. A., GONZÁLEZ, E., PÉREZ, D. Y OTERO, A. 1991. Calidad microbiológica del chorizo de Camtimpalos. In Proceedings of the 13<sup>th</sup> Meeting of the Spanish Society. Pág. 213. Salamanca, Spain.
- SANZ, Y., VILA, R., TOLDRÁ, F. Y FLORES, J. 1998. Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of non-fermented sausages. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 213-217.
- SAUNDERS, N.A. 2009. An introduction to Real-Time PCR *en* Real-Time PCR: Current Technology and Applications, Logan, J, Edwards, K. y Saunders, N. Eds. Norfolk, Caister Academic Press. 1-6.

- SAVIC, I.V. 1985. Small-scale sausage production. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/003/x6556e/X6556E00.htm>. Fecha acceso: 14-07-11.
- SAYRE, A. 1975. Rosalind Franklin and DNA. Ed. W.W. Norton & Company, New York.
- SCHLECH, W.F., LAVIGNE, P.M, BORTOLUSSI, R.A., ALLEN, A.C., HALDANE, E.V., HIGHTOWER, A.W., JOHNSON, S.E., KING, S.H., NICHOLLS, E.S. Y BROME, C.V. 1983. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *N. Eng. J. Med.* 308, 203-206.
- SCHLEIFER, K.H. 1986. Gram positive cocci, pp. 999-1100. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1<sup>st</sup> vol. 2. Eds: Sneath, P.A. Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md.
- SCHENEERBERGER, C., SPEISER, P., KURY, F. Y ZEILLINGER, R. 1995. Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain. *PCR Methods Appl.* 4, 234-238.
- SEDDON, H.R. 1922. Bulbar paralysis in cattle due to the action of a toxicogenic bacillus, with a discussion on the relationship of the condition to forage poisoning (botulism). *J. Comp. Pathol. Therap.* 35, 147-190.
- SEO, K. S. Y BOHACH, G.A. 2007. *Staphylococcus aureus*. En: Food Microbiology and Frontiers, 3<sup>a</sup> Ed. Eds: Doyle, M.P and Beuchat, L.R. ASM Press, Washington, D.C.
- SHAPIRO, R.L., HATHWAY, C.L. Y SWERDLOW, D.L. 1998. Botulism in the United States: a clinical and epidemiologic review. *Ann. Intern. Med.* 129, 221-228.
- SHELOBOLINA, E.S., SULLIVAN, S.A., O'NEILL, K.R., NEVIN, K.P. Y LOVLEY, D.R. 2004. Isolation, characterization, and u(VI)-reducing potential of a facultatively anaerobic, acid-resistant bacterium from low-pH, nitrate- and U(VI)-contaminated subsurface sediment and description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2959-2965.
- SHERIDAN, J.J., DOHERTY, A. Y ALLEN, P. 1992. Improving the safety and quality of meat and meat products by modified atmosphere and assessment by novel methods. FLAIR 89055 Iterim. 2<sup>nd</sup> year report EEC DGXII, Brussels.
- SIDDIQI, A.M., JENNINGS, V.M., KIDD, M.R., ACTOR, J.K. Y HUNTER, R.L. 1996. Evaluation of electrochemiluniscence and bioluminescence-based assays for quantitating specific DNA. *J. Clin. Lab. Anal.* 10, 423-431.

- SIEGEL, L.S. 1992. Destruction of botulinum toxins in food and water. *En: Hauschild A.H.W. and Dodds K.L. eds. Clostridium botulinum: Ecology and Control in Foods.* New York, Marcel Dekker. 323-341.
- Shutler, G.G. et al. 1999. Removal of a PCR inhibitor and resolution of DNA STR types in mixed human-canine stains from a five year old case. *J. Forensic. Sci.* 44, 623-626.
- Slutsker, L. and Schuchat, A. 1999. Listeriosis in humans, p. 75-79. In E.T. Roser and E.H. Marth eds., *Listeria, Listeriosis y Food Safety*, 2<sup>nd</sup> ed. Marcel Dekker, New York, N.Y.
- SMITH, G.R., MILLIGAN, R.A. Y MORYSON, C.J. 1978. *Clostridium botulinum* in aquatic environments in Great Britain and Ireland. *Journal of Hygiene, Cambridge* 80, 431-438.
- SMITH, G.R. Y YOUNG, A.M. 1980. *Clostridium botulinum* in British soil. *Journal of Hygiene, Cambridge* 85, 271-274.
- SMITH, W.H. 1963. The use of carbon dioxide in the transport and storage of fruits and vegetables. *Advances in Food Research*, vol 12, 95-146.
- SMITH, L.D.S. Y SUGIYAMA, H. 1988. Botulism: The Organism, Its Toxins, the Disease. 2<sup>nd</sup> ed. Illinois, CC Thomas.
- SOBEL, J., TUCKER, N., SULKA, A., MCLAUGHLIN, J Y MASLANKA, S. 2004. Foodborne botulism in the United States, 1990-2004. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 1606-1611.
- SOBEL, J. 2005. Botulism. *Clin. Infect. Dis.* 41, 1167-1173.
- SOFOS, J.N. 2008. Challenges to meat safety in the 21st century. *Meat Science* 78, 3-13.
- SOLOMON, H.M. Y LILLY Jr., T. 2001. *Clostridium botulinum*, en *Bacteriological Analytical Manual Online*. Disponible en: [www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-17.html](http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-17.html) Fecha acceso: 5-11-2010.
- SPAZIANI, M, DEL TORRE, M. Y STECCHINI M.L. 2009. Changes of physicochemical, microbiological and textural properties during ripening of Italian low-acid sausages. Proteolysis, sensory and volatile profiles. *MEAT SCIENCE* 81, 77-85
- STEMME, V. Y STEMME, S. 2004. Quantitative mRNA Analysis in Small Cell Samples by RT-PCR and Flow Cytometry en Weissensteiner, T., Griffin, H.G. y Griffin, A. Ed., *PCR Technology. Current Innovations.* USA, CRC. 23-28.

- STEWART, C.M., COLE, M.B., LEGAN, J.D., SLADE, L., VANDEVEN, M.H. AND SCHAFFNER, D.W. 2002. *Staphylococcus aureus* growth boundaries: moving towards mechanistic predictive models based on solute-specific effects. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1671-1864.
- STOFLET, E.S., KOEBERL, D.D., SARKAR, G. Y SOMMER, S.S. 1988. Genomic amplification with transcript sequencing. *Science* 239, 491-494.
- SU, Y.-C. AND WONG, A.C. 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin H. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1438-1443.
- SWAMINATHAN, B., CABANES, D., ZHANG, W. Y COSSART, P. 2007. *Listeria monocytogenes*. *En: Doyle, M.P. and Beuchat, L.R., Food Microbiology and Frontiers*, 3<sup>rd</sup> ed. Edited by ASM Press, Washington, D.C, 457-491.
- SWAMINATHAN, B. Y GERNE-SMIDT, P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes and Infection* 9, 1236-1243.
- SZABO ET AL., 1992. E.A. SZABO, J.M. PEMBERTON AND P.M. 1992. Desmarchelier, Specific detection of *Clostridium botulinum* type B by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, pp. 418–420.
- THIELER, A., VILJOEN, P.R., GREEN, H.H. DU TOIT, P.J., MEIER, H. Y ROBINSON, E.M. 1927. Lamsiekte (parabotulism) in cattle in South Africa. 11<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup> Report. Director Vet. Educ. Res. Part II, Sect. 5, 1201-1211. Dept. Agr. Union South Africa.
- THOLOZAN, J.L., CAPPELIER, J.M., TISSIER, J.P., DELATTRE, G. Y FEDERIGHI, M. 1999. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 1110-1116.
- THORNTON, L., GRAY, S., BINGHAM, P., HUTCHINSON, D.N., ROWE, B., NEWTON, D. AND SYED, Q. 1993. The problems of tracing a geographically widespread outbreak of Salmonellosis from a commonly eaten food-*Salmonella* Typhimurium DT193 in North-West England and North Wales in 1991. *Epidemiology and Infection*, 111, 465-471.
- TOLDRÁ, F. 2004. Curing: Dry. *En: Jensen, W., Devine, C. & Dikemann, M. eds. Encyclopedia of meat science.* Elsevier Science Ltd., London, 360-365.
- TOLDRÁ, F. 2006. The role of muscle enzymes in dry-cured meat products with different drying conditions. *Trends in Food Science & Technology* 17, 164-168.
- TOPLEY, W.W. Y WILSON, G.S. 1929. *The Principles of Bacteriology and Immunity*, vol. II. London, Edward Arnold and Co.

- TORRES, E. A. F.S., SHIMOKOMAKI, M., FRANCO, B.D.G.M., CARVALHO, JR., B.C. Y SANTOS, J.C. 1994. Parameters determining the quality of charqui an intermediate moisture meat product. *Meat Science*, 38, 229-234.
- TORRES, E. A.F. S., PEARSON, A.M., GRAY, J.L. Y SHIMOKOMAKI, M. 1989. Lipid oxidation in charqui (salted and dried beef). *Food Chemistry*, 32, 257-268.
- TSAI, Y.L. AND OLSON, B.H. 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2292-2295.
- TSUKAMOTO, K., MIKAMOTO, M., KOHDA, T., IHARA, H., WANG, S., MAEGAWA, T., NAKAMURA, S., KARASAWA, T. Y KOZAKI, S. 2002. Characterization of *Clostridium butyricum* neurotoxin associated with food-borne botulism. *Microb. Pathog.* 33, 177-184.
- TYÖPÖNEN, S., MARKKULA, A., PETÄJÄ, E., SUIHKO, M-L., MATTILA-SANDHOLM, T. 2003. Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. *Food Control* 14, 181-185.
- UEHARA, M., FUJIOKA, R.S. AND FRANK, H.A. 1965. Method for obtaining cleaned putrefactive anaerobe 3679 spores. *J. Bact.* 89:929-30.
- URDEA, M.S., FULTZ, T., ANDERSON, T.J., RUNNING, M., HAMREN, J.A., AHLE, S. Y CHANG, C.A. 1991. Branched amplification multimers for the sensitives, direct detection of human hepatitis viruses. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 24, 197-200.
- USFDA. 2000. High pressure processing, Kinetics of Microbial Inactivation for Alternative Food Processing Technologies, USFDA Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- UTERMANN, F. Y MÜLLER, C. 1992. Influence of aw value and storage temperature on the multiplication and enterotoxin formation of staphylococci in dry-cured raw hams. *Int. J. Food Microbiology*, 16, 109-115.
- VALIDATION LIST. N.º 102. 2005. Validation of publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSEM. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 55, 547-549.
- VAN COLLIE, E., WERBROUCK, K., HEYNDRICKX, M., HERMAN, I. Y RIJPENS, N. 2004. Prevalence and typing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat food products on the Belgian market. *J. Food Protect.* 67, 2480-2487.

- VAN DER RIET, W.B. 1976. The mycoflora of biltong and microbiological aspects of the mouldy biltong problem. MSc dissertation. University of Stellenbosch South Africa.
- VAN ERMENGEM, E. 1987. Classics in infectious diseases. A new aerobic bacillus and its relation to botulism. E. van Ermengem. (Originally published in 1987 as "Ueber einen neuen anaëroben Bacillus und seine Beziehungen zum Botulismus" in *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten* 26, 1-56). *Review on Infectious Diseases*, 1, 701-719.
- VARNAM, A.H. Y SUTHERLAND, J.P. 1998. Carne y productos cárnicos. Tecnología, química y microbiología. Ed. Acribia, Zaragoza.
- VESTERGAARD, E.M. 2001. Building product confidence with challenge studies. *Dairy Food Environ. Sanit.* 21, 206-209.
- VON HOLZER, E. 1962. Botulismus durch Inhalation. *Med. Klin.* 57, 1735-1738.
- WADE, N. 1976. Double-crossed in the helix race. *Trends in Biochemical Sciences* 1, 22.
- WALKER, G.T., LITTLE, M.C., NADEAU, J.G. Y SHANK, D.D. 1992. Isothermal *in vitro* amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 392-396.
- WATSON, J.D. Y CRICK, F.H. 1953. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* Vol.171, 737-738.
- WATSON, R.J. AND BLACKWELL, B. 2000. Purification and characterization of a common soil component which inhibits the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.* 46, 633-642.
- WIEDMANN, M., BARANY, F. Y BATT, C.A. 1993. Detection of *Listeria monocytogenes* with a nosisotopic polymerase chain reaction-coupled ligase chain reaction assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 2743-2745.
- WIENEKE, A.A., ROBERTS, D. AND GILBERT, R.J. 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. *Epidemiology and Infection*, 110, 519-531.
- WIKIPEDIA. 2009. Brote de listeriosis de 2008-2009 en Chile. Disponible en: [http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Brote de listeriosis de 2008-2009 en Chile](http://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Brote_de_listeriosis_de_2008-2009_en_Chile). Fecha acceso: 25-10-2010.
- WIMPFHIMER, L., ALTMAN, N.S. Y HOTCHKISS, J.H. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* Scout A, serotype 4 and competitive spoilage organism in raw

- chicken packaged under modified atmospheres and in air. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 205-214.
- VITAS, A.I., AGUADO, V. Y GARCÍA-JALÓN, I. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *Int. J. of Food Microbiol.* 90, 349-356.
- WITTBRODT, J. AND ERHARDT, W. 1989. An inexpensive and versatile computer-controlled PCR machine using a Peltier Element as a thermoelectric heat pump. *Trends Genet.* 5, 202-203.
- YABUUCHI, E. Y EZAKI, T. 2000. Arguments against the replacement of type species of the genus *Salmonella* from *Salmonella Cholerasuis* to “*Salmonella enterica*” and the creation of the term “neotype species”, and for conservation of *Salmonella cholerasuis*. *Int. J. Syst. Evolut. Microbiol.* 50, 1693-1694.
- YAM, K.L., TAKHISTOV, P.T. Y MILTZ, J. 2005. Intelligent packaging: Concepts and applications. *J. Food Science* 70, 1-10.
- YOSHII, T., TAMURA, K., TANIGUCHI, T., AKIYAMA, T. Y ISHIYAMA, I. 1993. Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal. *Nihon Hoigaku Zasshi* 47, 323-329.
- ZANARDI, E., DORIGONI, V., BADIANI, A. Y CHIZZOLINI, R. 2002. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of parking conditions. *Meat Science* 31, 7-14.
- ZHAO, Y., WELLS, J.H. Y MARSHALL, D.L. 1992. Description of log phase growth for selected microorganisms during modified atmosphere storage. *J. Proc. Engin.* 15, 299-317.





