



El sistema APPCC como herramienta para reducir el riesgo de aparición de *Listeria monocytogenes* en vegetales congelados

I. García Panadero¹, M. Álvarez-Ortí¹, A. Rabadán¹, J.E. Pardo¹

¹ E.T.S.I. Agrónomos y de Montes (UCLM), Campus Universitario s/n, 02071-Albacete (España);
manuel.alvarez@uclm.es

Resumen: La bacteria *Listeria monocytogenes* es actualmente la principal causa de muertes debida a enfermedades transmitidas por alimentos. Puede afectar en gran medida a las industrias de vegetales congelados, puesto que los alimentos no están sometidos a tratamientos térmicos diseñados para eliminarla del producto final. Para evaluar la incidencia de *Listeria* en una industria de vegetales congelados, se ha realizado un control microbiológico de superficies, en contacto o no con los alimentos, previo y posterior a la aplicación de una serie de medidas preventivas que se incluyeron en su sistema APPCC. En el análisis microbiológico previo no se detectó la presencia de *L. monocytogenes*, pero si aparecieron otra serie de bacterias en la mayor parte de las superficies muestreadas. La disminución en la carga microbiana en la mayoría de estas superficies después de implantar las medidas preventivas, demuestran su eficacia en la lucha contra la contaminación microbiológica. Las medidas preventivas implantadas consistieron básicamente en la compra de materias primas a proveedores de bajo riesgo, la modificación del plan de limpieza y desinfección para evitar salpicaduras, incluyendo formación al personal, y cambios en los flujos de personal para evitar que pasen de una zona sucia a una limpia.

Palabras clave: medidas preventivas; plan de higiene; inocuidad de alimentos

1. Introducción

El consumo de vegetales está ampliamente recomendado para reducir la incidencia de muchas enfermedades cardiovasculares o ciertos tipos de cáncer [1,2]. Para poder disponer de vegetales durante cualquier época del año, se puede recurrir a la tecnología de la congelación, que además permite un mejor uso al incrementar la vida útil de éstos [3], contribuyendo a reducir el desperdicio estimado del 25 % del total de los alimentos suministrados a nivel de consumidor, que se produce debido al carácter perecedero de los mismos [4,5]. A pesar de que la congelación de vegetales es una tecnología que permite mantener la mayor parte de los nutrientes de los vegetales, puede presentar una serie de riesgos microbiológicos para el consumidor, puesto que en este proceso los alimentos no se someten a tratamientos térmicos de conservación diseñados para la eliminación de la carga microbiana. En este punto, cobra especial importancia la aparición de la bacteria *Listeria monocytogenes*, causante de la enfermedad conocida como listeriosis.

La listeriosis presenta síntomas similares a la gripe u otras enfermedades transmitidas por alimentos, como diarreas o fiebre que en muchos casos no suele ser diagnosticada, pero en ciertos grupos de riesgo como personas ancianas, inmunodeprimidas o mujeres embarazadas puede llegar a ser una enfermedad grave y producir septicemias o meningitis, presentando una ratio de

mortalidad del 30 % [6]. Aunque las medidas de control, que se empezaron a implantar en las industrias alimentarias a partir de la década de los 90, y las mejoras de las condiciones higiénicas actuales han reducido la prevalencia de *L. monocytogenes* en muchas categorías de alimentos, esta bacteria todavía sigue siendo una causa importante de enfermedad transmitida por alimentos [7]. En 2013, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) reportó la presencia de 1763 casos de listeriosis confirmada en humanos, en 27 estados miembros de la UE, lo que supone una incidencia de 0,44 casos por cada 100.000 habitantes [8]. Estos datos suponen que la listeriosis ocupa el quinto lugar en cuanto a enfermedades de transmisión alimentaria. La mayor parte de estos casos requirieron hospitalización (99,1 %), reportándose un total de 191 fallecimientos, lo que convierte a la listeriosis en la enfermedad de transmisión alimentaria que más muertes provoca en la UE. Recientemente ha surgido un brote de *Listeria* en Austria, Dinamarca, Finlandia, Suecia y Reino Unido, debido al consumo de vegetales congelados provenientes de una planta de congelados de vegetales de Hungría [9], con 47 personas afectadas, entre las cuales se produjeron 9 fallecimientos, y que ha provocado el cese de actividad de dicha planta.

L. monocytogenes se suele encontrar presente en una gran variedad de hábitats relacionados con las industrias alimentarias. Puede encontrarse ampliamente en el suelo, en los vegetales, o en muestras superficiales de agua, así como en instalaciones dedicadas a la actividad agrícola y ganadera [7,10]. Una vez que coloniza las instalaciones de la industria, lo que se produce por vía ambiental, en la suela de los zapatos de los trabajadores, o bien por medio de materias primas contaminadas, es una bacteria muy difícil de combatir. Presenta una elevada capacidad para la formación de biofilms mono o multiespecíficos, lo que le confiere resistencia a muchos tratamientos desinfectantes [11], y la consiguiente capacidad de colonizar distintas superficies dentro de la industria [12], donde puede persistir durante años. Por lo tanto, la necesidad de encontrar un método de control eficaz, que reduzca el riesgo de aparición de *Listeria* en los alimentos, es un reto al que se enfrentan la mayor parte de las industrias alimentarias en la actualidad. Esta necesidad es mayor en aquellas que ofrecen productos que no están sometidos a tratamientos térmicos, que se consumen frescos o con un mínimo procesado.

El sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) es una herramienta de gestión de la seguridad de los alimentos, de obligado cumplimiento para todas las industrias del sector agroalimentario [13]. Se trata de aplicar una serie de medidas con un enfoque preventivo, mediante las que se identifican, evalúan y controlan los posibles peligros que pueden aparecer en los alimentos. Es un sistema dinámico que permite hacer frente a la aparición de organismos patógenos emergentes y toxiinfecciones alimentarias derivados de los nuevos hábitos de consumo, basado en la aplicación de una serie de principios, mediante los que se consigue un control más detallado y metódico de las diferentes etapas del proceso de producción. De esta manera se garantiza la inocuidad de los alimentos producidos, y se da una respuesta más rápida a las posibles eventualidades surgidas, convirtiéndose en el método más ampliamente aceptado y considerado como la mejor manera de proteger a los consumidores de daños transmitidos por los alimentos [14].

El objetivo de este trabajo es proponer las medidas higiénico sanitarias necesarias para minimizar el riesgo de aparición de *L. monocytogenes* en el producto final de una industria dedicada a la elaboración de vegetales congelados, de tal forma que pueda adaptarse su sistema APPCC teniendo en cuenta el control específico de esta bacteria. Para ello es necesario realizar un estudio detallado del diagrama de flujo de la industria, mediante el que se detecten aquellas operaciones donde existe riesgo de contaminación con *Listeria*. El diagrama de flujo, junto con la observación directa en las instalaciones de la fábrica, aportará información sobre las superficies, en contacto con los alimentos o no, que son susceptibles de contaminación y que pueden originar una contaminación cruzada del producto final. En estas superficies se realizará un muestreo microbiológico para detectar la presencia de *Listeria*, y se estudiarán las medidas necesarias para evitar su entrada en la industria.

2. Materiales y métodos

2.1. Características de la industria

El presente trabajo se ha realizado en las instalaciones de la industria Ultracongelados Campo Verde S.L., situada en la calle Autovía, nº 72 del Polígono Industrial Campollano, al Norte de la ciudad de Albacete. Aunque la industria se encuentra en un entorno urbano, está cerca de otras industrias agroalimentarias. Es especialmente destacable reseñar que se encuentra lindando con una empresa de semillas, que atrae animales como roedores o pájaros, que pueden ser vectores de una posible contaminación microbiológica.

La industria se dedica al congelado de una amplia gama de vegetales, entre los que se incluyen: Aceituna, apio, alcachofa, berenjena, brócoli, calabacín, calabaza, cebolla, coliflor, guisante, hinojo, maíz, pepino, pimiento, puerro, romanesco, tomate.

La industria dispone de una zona de recepción de materias primas al aire libre, donde se pueden realizar las primeras operaciones de limpieza, aislada de la nave de acondicionamiento en la que se realizan las operaciones en las que se preparan las materias primas para el congelado. En esta se realiza también la operación de escaldado, con agua caliente. Los túneles de congelado separan esta nave de la zona de selección y envasado del producto congelado. La industria además cuenta con otra nave de reenvasado, así como de cámaras de almacenamiento del producto congelado.

2.2. Diseño experimental

Para la detección de *L. monocytogenes* en las instalaciones de la industria, se realizó un muestreo de superficies, teniendo en cuenta tanto aquellas superficies que pueden estar en contacto con los alimentos, como las que no, que pueden servir de reservorio a la *Listeria* y provocar la contaminación cruzada en cualquier momento. Por lo tanto, en primer lugar, se realizó un estudio *in situ* detallado del diagrama de flujo del proceso, con el objeto de localizar todas aquellas superficies más propensas de poder producir la contaminación de los alimentos con *Listeria*, que quedan reflejadas en la tabla 1.

Tabla 1. Superficies muestreadas para el análisis microbiológico

ZONA	Superficie muestreada
ZONA 1. DESPERDICIOS	Z.1.1. Cinta transportadora de destrío
	Z.1.2. Zona de paso con charco
ZONA 2. RECEPCIÓN	Z.2.1. Guantes de personal de selección
	Z.2.2. Cinta de selección
	Z.2.3. Alcantarilla de la zona de recepción
ZONA 3. ACONDICIONAMIENTO	Z.3.1. Cinta de desgranado
	Z.3.2. Cinta de selección de acondicionamiento
	Z.3.3. Alcantarilla de acondicionamiento
	Z.3.4. Lavadora
ZONA 4. ESCALDADO Y CONGELADO	Z.4.1. Escaldador
	Z.4.2. Cinta del escaldador
	Z.4.3. Alcantarilla del escaldador
	Z.4.4. Cinta del túnel de congelado
	Z.4.5. Suelo del túnel de congelado
	Z.4.6. Alcantarilla del túnel de congelado
	Z.4.7. Cinta de salida del túnel
	Z.4.8. Cinta del selector artificial

En estas superficies se realizó un muestreo previamente a la adopción de medidas preventivas del APPCC. Para ello, se empleó un hisopo Path-Check Higiene, mediante el que se muestreó un área de 10x10 cm. Posteriormente se transfirió al caldo de detección de patógenos y se observó si se producía el cambio de color tras una incubación a 25°C durante 24-48 h (negro indica positivo, amarillo indica negativo). Para la confirmación de la presencia de *L. monocytogenes* se procedió a la siembra en placas con *Compass Listeria Agar*, donde las colonias de *L. monocytogenes* aparecen como colonias de color azul rodeadas de un halo blanco.

Una vez evaluado el resultado del análisis microbiológico, se diseñaron y aplicaron una serie de medidas preventivas para reducir la incidencia microbiológica en todas estas superficies, y se repitió el muestreo de la misma manera para evaluar la eficacia de estas medidas. Este segundo muestreo se realizó en dos momentos: antes de empezar la producción, lo cual permite evaluar la eficacia del plan de limpieza y desinfección, y después de la producción, para evaluar la posible contaminación de los alimentos durante el proceso.

De esta forma, se planificaron los muestreos microbiológicos de la siguiente manera:

- MUESTREO 1. Toma de muestras por la mañana antes de empezar la producción, sin ninguna medida preventiva.
- MUESTREO 2. Toma de muestras, por la mañana antes de empezar la producción tras la aplicación de medidas preventivas.
- MUESTREO 3. Toma de muestras, tras la toma de medidas preventivas, después de la fabricación de productos congelados.

2.3. Confirmación

A pesar de emplear medios de cultivo específicos para el crecimiento de *L. monocytogenes*, en ciertas ocasiones se puede apreciar el crecimiento de colonias que puede resultar dudosas, por lo que se procedió a identificar las bacterias presentes en las placas mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación del gen 16S rRNA [15]. Para ello, en primer lugar, se extrajo el ADN genómico de las colonias crecidas en las placas mediante el kit PureLink® Pro 96 Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). El ADN purificado se cuantificó mediante espectrofotometría y se evaluó su integridad mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

Posteriormente se realizó la amplificación parcial del gen 16S rRNA mediante PCR, empleando los primers universales para bacterias 8F (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y 1492R (GGTTACCTTGTTACGACTT). La PCR consistió en 30 ciclos con un primer paso de desnaturalización de 1 minuto a 95°C, un paso de anillamiento de 1 minuto a 53°C, y un paso final de extensión de 1 minuto a 72°C. La PCR se completó con un paso inicial de desnaturalización de 10 minutos a 95°C y un paso final de extensión a 72°C de 7 minutos. El producto de PCR se visualizó en geles de agarosa al 2% y el fragmento resultante de la amplificación se purificó de los geles empleando el kit PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA). El fragmento de PCR purificado se envió para su secuenciación mediante el método Sanger (Macrogen Spain, Madrid).

3. Resultados y discusión

3.1. Diagrama de flujo

La elaboración del diagrama de flujo de la industria presenta la dificultad de la cantidad de materias primas que procesa, algunas de ellas pueden tener un procesado diferente, principalmente en las operaciones de acondicionamiento. En la figura 1 se muestra el diagrama de flujo del proceso de congelación de todas estas materias primas. El estudio del diagrama de flujo, junto con el conocimiento del proceso y la observación en la propia industria, permite identificar aquellas superficies que son más susceptibles de ser colonizadas por *Listeria*, y que serán aquellas

que deben ser incluidas para la realización del control microbiológico mediante el que se monitorice la presencia de *L. monocytogenes* en la industria.

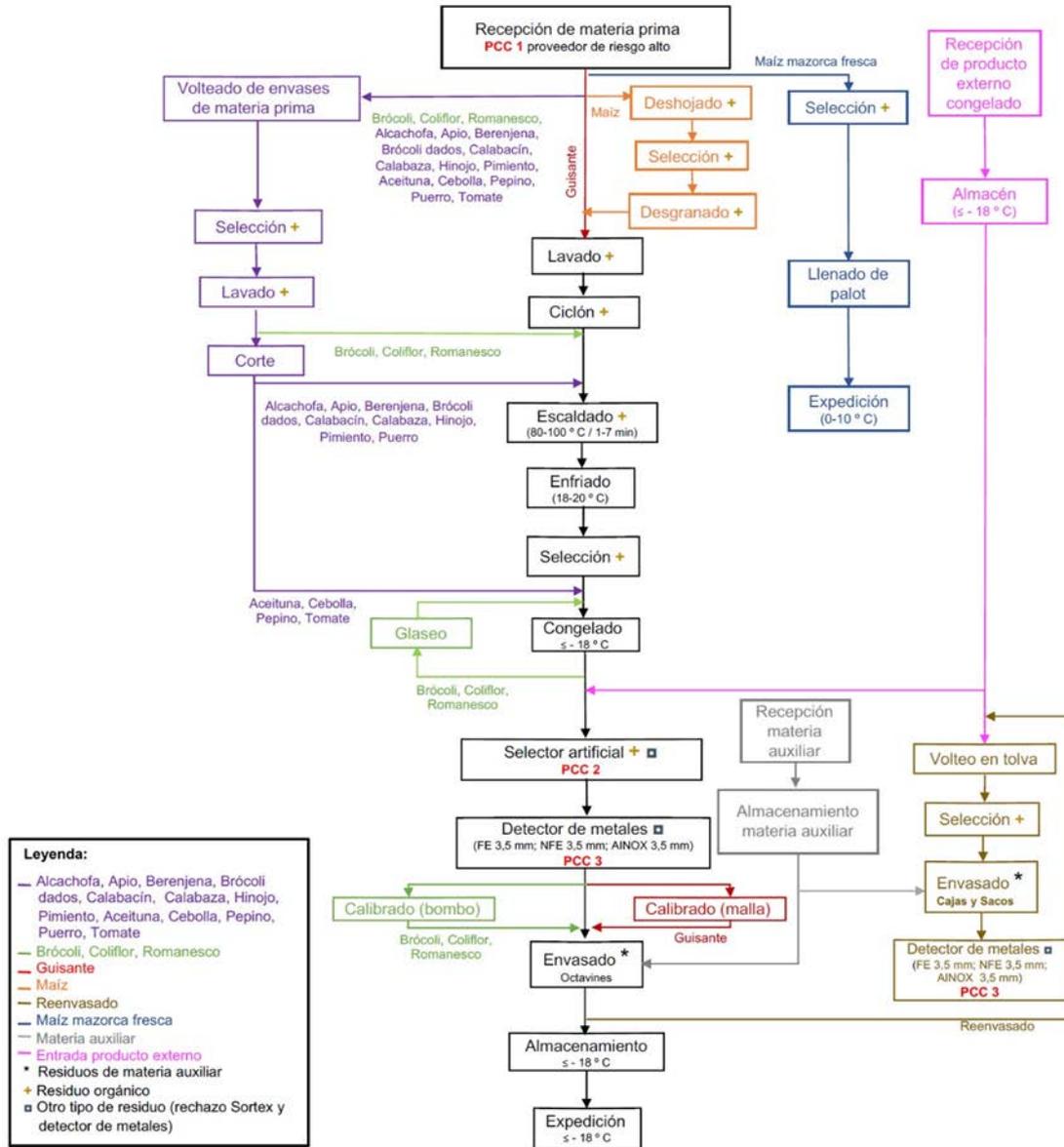


Figura 1. Diagrama de flujo del proceso de congelación de vegetales en la industria Ultracongelados Campo Verde S.L.

La recepción de las materias primas es una etapa fundamental para evitar la colonización de la fábrica por *Listeria*, puesto que la vía más probable de entrada es mediante materias primas que pueden estar contaminadas en el campo [16]. Esta etapa se considera punto de control crítico (PCC) cuando la materia prima llega de un proveedor considerado de alto riesgo, siendo éstos los que proporcionan materias primas sin ningún tipo de información, ni libro de campo, ni análisis de productos químicos, y que carecen de certificaciones tales como Global Gap. En este caso, la etapa de recepción debe ser monitorizada y controlada, teniendo en cuenta las acciones correctoras que deben considerarse en el caso de que se detecte alguna anomalía. Además, la recepción de muchos productos se produce al aire libre, con la posibilidad de la formación de

charcos, circunstancia que se agrava con la caída de material vegetal procedente de las tolvas de recepción. El agua se suele evacuar hacia alcantarillas, que también será necesario muestrear. Debe procurarse tomar las muestras de lugares poco accesibles o que presenten dificultades en su desinfección, de tal forma que se pueda asegurar que no están actuando como reservorio microbiológico.

El escaldado es otra operación importante, que permite inactivar microorganismos en su forma vegetativa, incluyendo los patógenos [17]. Sin embargo, el escaldado no es una operación diseñada para eliminar todos los peligros microbiológicos presentes en los alimentos. En el caso de *Listeria*, el tratamiento de escaldado correctamente aplicado puede ser suficiente de acuerdo con la resistencia térmica de *L. monocytogenes* [18], aunque es necesario considerar que no se debe someter a *Listeria* a temperaturas subletales, pues éstas pueden inducir resistencias al estrés térmico que pueden propiciar la proliferación y persistencia de *L. monocytogenes* en toda la zona del escaldador. Las temperaturas subletales pueden darse si el tratamiento no se hace correctamente, o cuando éste se realiza a temperaturas bajas. Por lo tanto, deberá controlarse que la temperatura y tiempo de tratamiento en el escaldador son adecuadas. En cualquier caso, será conveniente asegurarse que el producto sale del escaldador libre de *L. monocytogenes*, puesto que en el proceso de congelado no se va a realizar ninguna otra operación de esterilización o inactivación de microorganismos.

En las últimas etapas del proceso, el producto no se va a someter a ningún tipo de tratamiento térmico que pueda reducir su carga microbiana, así que es fundamental que en estas etapas no se produzca la contaminación microbiológica. La congelación se produce, en cualquier caso, a temperaturas inferiores a -30°C, y a partir de esta etapa, el producto debe mantenerse a una temperatura de -18°C por lo que, en general, el crecimiento microbiológico se ve ralentizado o detenido. Sin embargo, *L. monocytogenes* puede sobrevivir a estas temperaturas, e incluso proliferar, por lo que es fundamental asegurarse de que todas las instalaciones en esta última parte del proceso están libres de *L. monocytogenes*, de tal forma que no se produzca la contaminación cruzada de los vegetales congelados.

3.2. Muestreo microbiológico

Una vez estudiado el diagrama de flujo de la industria, se han identificado todas aquellas superficies susceptibles de contaminación microbiológica, para lo que se tuvieron en cuenta aquellos factores que pueden determinar una mayor proliferación de *Listeria* (lugares con mayor humedad, lugares de difícil acceso para la limpieza, lugares afectados por el paso del personal o materia de destrío, lugares de acumulación de producto, etc.). En este punto, debido a la persistencia y la capacidad de colonización de *L. monocytogenes*, se han tenido en cuenta, tanto las superficies en contacto directo con los alimentos, como las que no lo están, como alcantarillas y suelos de la fábrica donde se producen acumulaciones de humedad. Los resultados del análisis microbiológico de superficies previo a la implantación de medidas preventivas se muestran en la tabla 2.

No se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en ninguna de las superficies muestreadas, que en las placas empleadas con *Compass Listeria Agar* deben aparecer formando colonias de color azul rodeadas de un halo blanco. Sin embargo, a pesar de que el sistema de detección empleado es específico para *L. monocytogenes*, en algunos casos puede apreciarse el crecimiento de otras colonias en las placas. Este crecimiento se produjo en la mayor parte de las superficies analizadas, indicando una alta presencia de microorganismos.

En concreto, se aprecia el crecimiento de 2 tipos de bacterias: uno da lugar a colonias blancas y la otra da lugar a colonias azules (figura 2). La presencia de otros microorganismos puede ser un problema, aunque éstos no sean patógenos, debido al incremento en la resistencia a distintos tratamientos desinfectantes cuando *Listeria* forma biofilms multiespecíficos [11]. Por lo tanto, se

identificaron estas bacterias para evaluar su potencial peligrosidad y descartar que pertenecieran a algún serotipo de *Listeria*.

Tabla 2. Resultados del análisis microbiológico de superficies previo a la implantación de medidas preventivas

Superficie muestreada	Presencia de <i>L. monocytogenes</i>	Presencia de otros microorganismos
Z.1.1. Cinta transportadora de destrío	-	+
Z.1.2. Zona de paso con charco	-	+
Z.2.1. Guantes de personal de selección	-	+
Z.2.2. Cinta de selección	-	-
Z.2.3. Alcantarilla de la zona de recepción	-	+
Z.3.1. Cinta de desgranado	-	+
Z.3.2. Cinta de selección de acondicionamiento	-	+
Z.3.3. Alcantarilla de acondicionamiento	-	+
Z.3.4. Lavadora	-	+
Z.4.1. Escaldador	-	+
Z.4.2. Cinta del escaldador	-	+
Z.4.3. Alcantarilla del escaldador	-	+
Z.4.4. Cinta del túnel de congelado	-	-
Z.4.5. Suelo del túnel de congelado	-	-
Z.4.6. Alcantarilla del túnel de congelado	-	+
Z.4.7. Cinta de salida del túnel	-	+
Z.4.8. Cinta del selector artificial	-	+

- indica ausencia del microorganismo

+ indica presencia de microorganismos

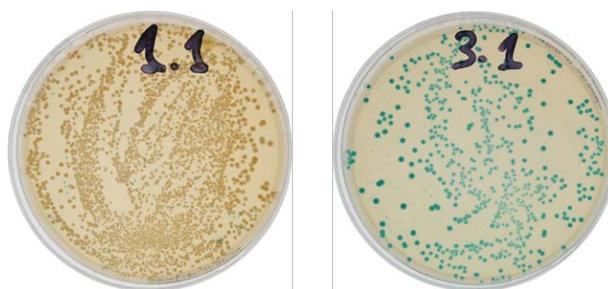


Figura 2. Aspecto de las colonias aparecidas en el muestreo microbiológico para la detección de *L. monocytogenes* en placas con *Compass Listeria Agar*

La secuenciación del gen 16S rRNA es una de las técnicas más usadas para la identificación de bacterias [19,20]. En este caso, se seleccionaron 5 colonias diferentes de cada tipo (blancas y azules). El ADN genómico extraído de estas colonias mostró una elevada integridad, y el fragmento amplificado mediante PCR se resolvió como una única banda del tamaño esperado. Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos de secuencias bacterianas del gen 16S rRNA del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Los resultados confirman la ausencia de *L. monocytogenes*, pues las secuencias de ADN obtenidas indicaron que los microorganismos que formaron las colonias no se corresponden con ninguna especie de *Listeria*. En concreto, las colonias de color blanco mostraron similitud con *Staphilococcus edaphicus*, mientras que las azules mostraron similitud con *Enterococcus gallinarum*. En ningún caso se han identificado

estas especies de bacterias como patógenos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria en humanos.

3.3. Medidas preventivas

A pesar de que no se ha detectado la presencia de *L. monocytogenes* en ninguna de las muestras de superficies, esto no quiere decir que se pueda dejar de monitorizar y controlar estas superficies. Es necesario tomar medidas para reducir la presencia de otras bacterias, que no originan enfermedades alimentarias, pero que pueden contribuir a la formación de biofilms multiespecíficos en los que pueden asociarse a *L. monocytogenes*, y que pueden ser muy difíciles de erradicar por su resistencia a tratamientos desinfectantes. Por lo tanto, se planificaron una serie de medidas preventivas, modificando el sistema APPCC, para reducir en lo posible la presencia microbiológica en todas las superficies de la fábrica.

Uno de los principales riesgos para la colonización de *Listeria* y de otros microorganismos en las industrias agroalimentarias es la entrada de materias primas contaminadas. Por ello es necesario disponer de información de los proveedores, que permita garantizar la seguridad de la materia prima que entra en la fábrica. Se estableció un protocolo de evaluación de proveedores en alto, medio y bajo riesgo, facilitando así la información sobre el riesgo que presentan las materias primas que provienen de cada proveedor. Los proveedores de bajo riesgo facilitan a la empresa los certificados de calidad, el APPCC (flujo de proceso, cuadro de gestión y cuadro de PCC), analíticas multiresiduos, y libro de campo con los tratamientos realizados al cultivo. Los certificados de calidad reconocidos por la GFSI (*Global Food Safety Initiative* o Iniciativa Global de Seguridad Alimentaria) como: IFS, BRC, FSSC 2000 (ISO 22000 y 22003 y Global Gap) dan una idea del sistema de calidad y seguridad alimentaria que presentan los proveedores de las materias primas y asegura la implantación de las buenas prácticas, manual de calidad, procedimientos, instrucciones y registros.

Otra de las principales fuentes de contaminación microbiológica de los alimentos es el contacto directo con los manipuladores. A pesar de que la industria dispone de medidas higiénicas, de obligado cumplimiento, entre las que se encuentra el lavado minucioso de las manos de todos los manipuladores, se considera que el uso de guantes puede reducir el riesgo de contaminación microbiológica. Por lo tanto, como medida preventiva para evitar la contaminación microbiológica de las materias primas y productos terminados por parte del personal interno de la empresa, se establece el uso obligatorio de guantes desechables o la desinfección de guantes no desechables en todas las etapas del proceso. Además, se estableció la obligatoriedad de la limpieza de las suelas de las botas de todas las personas que accedan al interior de la fábrica. Esta limpieza se debe producir, tanto antes del acceso a fábrica como en el paso de la zona sucia a la limpia, para evitar que éstas sean un vehículo de entrada de *Listeria* al interior de las instalaciones.

Otra medida preventiva esencial que se considera necesario establecer, y a la que se debe prestar especial atención, es la mejora del plan de limpieza y desinfección. El plan debe modificarse de tal forma que la limpieza se produzca evitando salpicaduras de agua del suelo o de las rejillas del alcantarillado a la línea de procesado, debido a la presión excesiva del agua utilizada al realizar la limpieza. Estas salpicaduras pueden originar la dispersión de los microorganismos del suelo hacia superficies en contacto con los alimentos provocando su contaminación cruzada. Para que el plan sea efectivo, se dio formación teórica y práctica al equipo de limpieza interno, entregándoles una copia del plan establecido de limpieza y desinfección, con el programa por zonas y máquinas donde se reflejan los productos químicos de limpieza y desinfección a utilizar, las dosis a utilizar y los tiempos que deben dejarse actuar los desinfectantes.

Además, como medida preventiva para evitar la contaminación microbiológica del alimento por parte del personal, se estudió el flujo de paso del personal en las distintas etapas de producción, el flujo de paso de las visitas, el flujo de la limpieza y el flujo de la materia prima y

producto final. Se consideró necesario cambiar el flujo de personal y el flujo de visitas, así como recordar y exigir el cumplimiento del flujo de limpieza. El flujo de personal y de visitas permitía pasar al personal de selección, manipuladores, jefe de línea y a las personas que acceden a la fábrica en calidad de visitantes, de la zona de recepción de la materia prima, una zona considerada como menos aséptica, a la zona de procesado, considerada como una zona aséptica, lo que favorece la contaminación microbiológica. Este flujo se ha cambiado, haciendo pasar al personal de la zona de materias primas, al vestuario y baño, para cambiarse de ropa y calzado antes del acceso a la zona de fabricación, en el caso de tener que acceder. En todo momento se evita el acceso de una zona a otra si no es necesario, así como el cambio del personal de unas zonas a otras (figura 3). Para evitar el paso del personal de la zona menos aséptica a la zona de fabricación se instaló una puerta de personal cerrada con llave, controlada por el departamento de calidad. Además, se modificó el flujo de las visitas, de tal forma que se comience por el vestuario y baño, entrando en primer lugar a la zona de fábrica y saliendo por las zonas más contaminadas, evitando volver a pasar por las zonas de fabricación. De esta forma, las visitas siempre avanzan de las zonas limpias hacia las sucias, y no al revés, donde habría mayor riesgo de extender la contaminación.

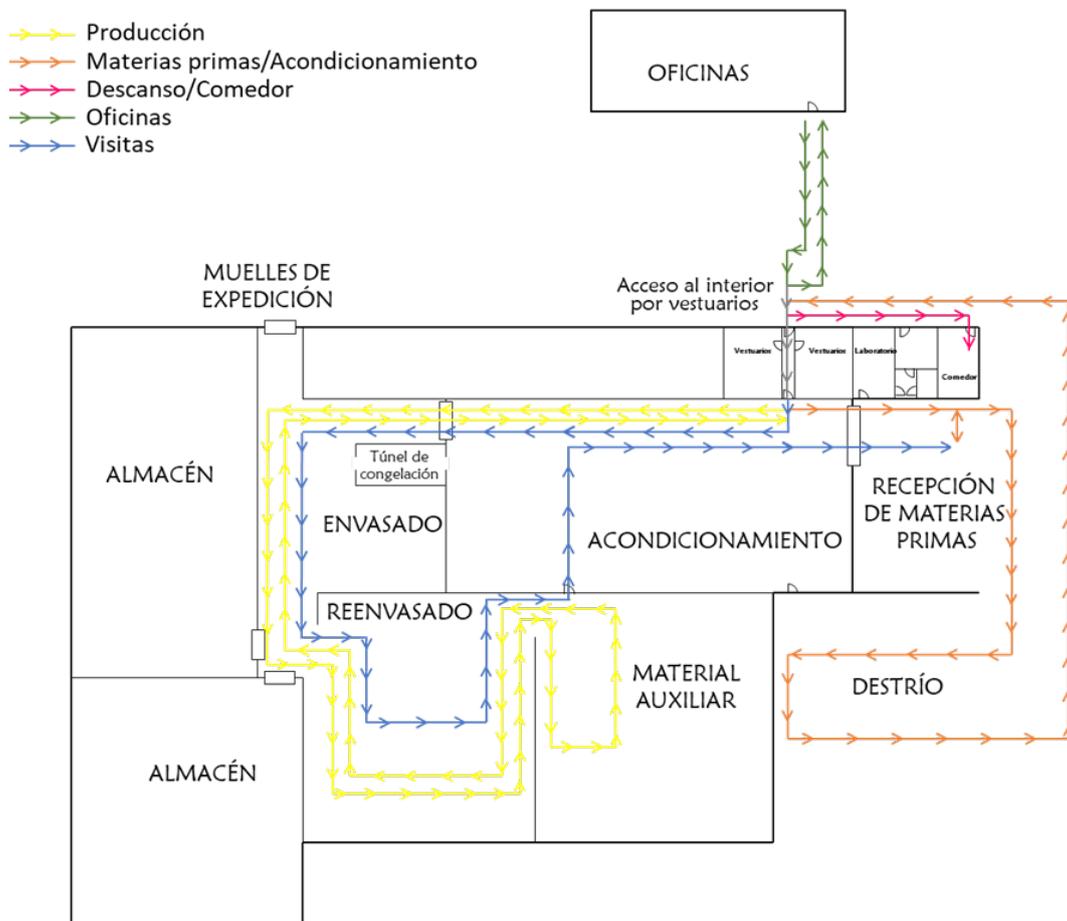


Figura 3. Esquema de los flujos de personal en el interior de la fábrica

Finalmente, como medida preventiva de control y monitorización de microorganismos, se estableció un plan de muestreos microbiológicos para comprobar la eficacia de la higiene del personal, la eficacia de la limpieza y desinfección de las superficies y otras medidas preventivas, así como la carga microbiana de las materias primas y producto finales. En el plan anual de

analíticas se estableció realizar análisis microbiológicos de superficies en contacto con el alimento (cintas, elevadores, tolvas) con una frecuencia de tres veces al mes. Asimismo, se estableció el análisis de superficies sin contacto con el alimento (suelo, pared, alcantarillas) con una frecuencia de cinco veces al mes, para comprobar su limpieza y desinfección. Se estableció realizar análisis microbiológicos de las manos de los manipuladores (con y sin guantes) para verificar la higiene del personal, con una frecuencia de 2 manipuladores aleatorios al mes de forma interna y un análisis por trimestre de forma externa. Además, se estableció la realización de un análisis microbiológico de las materias primas por producto y del producto final por lote.

3.4. Eficacia de las medidas preventivas

Después de la implantación de las medidas preventivas, se repitió el análisis microbiológico en las mismas superficies, para evaluar su eficacia. En este caso, los resultados dieron negativo, tanto en *L. monocytogenes* como en otros microorganismos en todas las superficies antes de iniciar la producción (tabla 3).

Tabla 3. Resultados del análisis microbiológico de superficies después de la implantación de medidas preventivas, antes del inicio de la producción y después

Superficie muestreada	Antes de la Producción		Después de la Producción	
	Presencia de <i>L. monocytogenes</i>	Presencia de otros microorganismos	Presencia de <i>L. monocytogenes</i>	Presencia de otros microorganismos
Z.1.1. Cinta transportadora de destrío	-	-	-	+
Z.1.2. Zona de paso con charco	-	-	-	-
Z.2.1. Guantes de personal de selección	-	-	-	-
Z.2.2. Cinta de selección	-	-	-	-
Z.2.3. Alcantarilla de la zona de recepción	-	-	-	-
Z.3.1. Cinta de desgranado	-	-	-	+
Z.3.2. Cinta de selección de acondicionamiento	-	-	-	-
Z.3.3. Alcantarilla de acondicionamiento	-	-	-	-
Z.3.4. Lavadora	-	-	-	-
Z.4.1. Escaldador	-	-	-	-
Z.4.2. Cinta del escaldador	-	-	-	-
Z.4.3. Alcantarilla del escaldador	-	-	-	+
Z.4.4. Cinta del túnel de congelado	-	-	-	-
Z.4.5. Suelo del túnel de congelado	-	-	-	-
Z.4.6. Alcantarilla del túnel de congelado	-	-	-	-
Z.4.7. Cinta de salida del túnel	-	-	-	-
Z.4.8. Cinta del selector artificial	-	-	-	-

- indica ausencia del microorganismo

+ indica presencia de microorganismos

En el análisis realizado después de la producción, se detectó presencia de microorganismos en la cinta de destrío y en la cinta de desgranado. Estas superficies están en contacto con residuos de la limpieza de las materias primas en el caso de la cinta de destrío, o directamente con materias primas antes de operaciones de lavado en el caso de la cinta de desgranado, lo que puede indicar que la contaminación viene directamente de estas materias primas. Aunque los proveedores sean de bajo riesgo, la entrada de las materias primas es una etapa fundamental, que debe ser controlada mediante análisis microbiológicos periódicos para garantizar la producción de alimentos seguros. Hay que destacar que la colonización más frecuente por *Listeria* en las industrias agroalimentarias se debe a la entrada de materias primas contaminadas.

Además, se apreció el crecimiento de colonias en las placas provenientes del muestreo de la alcantarilla del escaldador, mostrando que este debe ser un lugar de control importante. Este punto tiene la característica de evacuar agua caliente, procedente del proceso de escaldado, que una vez se enfría a temperaturas subletales, dan lugar a las condiciones ideales para el crecimiento

de microorganismos. Por lo tanto, este punto debería ser una zona donde el equipo de limpieza y desinfección interno preste especial atención.

El resultado obtenido no implica que la fábrica esté completamente libre de microorganismos, pues en el análisis solo se han considerado aquellos que formaron colonias en las placas empleadas, con *Compass Listeria Agar*. Sin embargo, los resultados sí que muestran una clara disminución de la carga microbiológica de estas superficies, indicando la efectividad de las medidas adoptadas. El mantenimiento de estas medidas, junto con la vigilancia y el control microbiológico periódico, deben permitir asegurar la producción de vegetales congelados libres de *L. monocytogenes*.

4. Conclusiones

Se ha realizado un estudio del diagrama de flujo de la industria Ultracongelados Campo Verde, evaluando aquellas zonas que presentan un mayor riesgo de contaminación microbiológica, atendiendo principalmente a la posible presencia de residuos de material orgánico y humedad. Del análisis microbiológico, efectuado en las diferentes superficies con riesgo de contaminación, se deduce la ausencia de *L. monocytogenes* en toda la fábrica. Sin embargo, en la mayor parte de las superficies muestreadas se apreció la presencia de otras especies de microorganismos, apareciendo en las placas empleadas en los análisis dos tipos de bacterias, que dieron lugar al crecimiento de colonias blancas y azules. Para descartar que éstos corresponden a serotipos de *Listeria* se han identificado mediante secuenciación del gen 16S rRNA, resultando ser bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Enterococcus*, no patógenos.

Para tratar de reducir la incidencia de contaminación microbiológica, se implantaron una serie de medidas preventivas: Compra a proveedores de bajo riesgo, que faciliten a la empresa los certificados de calidad, el APPCC, las analíticas multiresiduos, y el libro de campo con los tratamientos realizados al cultivo; uso de guantes desechables en todas las etapas del proceso y desinfección de los guantes reutilizables de manera diaria, antes de empezar la producción; limpieza de las suelas de las botas al entrar a la fábrica, o al pasar de la zona sucia a la zona limpia; mejora de la etapa de limpieza y desinfección, haciendo hincapié en la formación al personal de limpieza interno para evitar salpicaduras al emplear agua a presión; estudio de flujos de personal, estableciendo nuevos flujos de las visitas, y evitando accesos innecesarios del personal de la zona sucia a la zona limpia; establecimiento de un plan de muestreos microbiológicos para descartar la presencia de *L. monocytogenes*, tanto en superficies en contacto directo con los alimentos como aquellas que no lo están, principalmente alcantarillas de desagüe. La implantación de estas medidas preventivas resultó positiva, pues consiguió eliminarse la presencia de microorganismos en todas las superficies en las que se detectó en el primer análisis microbiológico.

5. Agradecimientos

El presente trabajo se ha realizado gracias a la colaboración de la industria Ultracongelados Campo Verde S.L.

Referencias

1. Liu R.H. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Advances in Nutrition*. 2013, 4, 384S-392S.
2. Slavin J.L., Lloyd B. Health benefits of fruits and vegetables. *Advances in Nutrition*. 2012, 3, 506-516.
3. Janssen A.M., Nijenhuis-de Vries M.A., Boer E.P.J., Kremer S. Fresh, frozen, or ambient food equivalents and their impact on food waste generation in Dutch households. *Waste Management*. 2017, 67, 298-307.
4. Secondi L., Principato L., Laureti T. Household food waste behavior in EU-27 countries: A multilevel analysis. *Food Policy*. 2015, 56, 25-40.

X CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA
X CONGRESSO IBÉRICO DE AGROENGENHARIA

3 – 6 septiembre 2019, Huesca - España

5. Stancu V., Haugaard P., Lähteenmäki L. Determinants of consumer food waste behavior: Two routes to food waste. *Appetite*. 2016, 96, 7-17.
6. Lomonaco S., Nucera D., Filipello V. The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States. *Infection, Genetics and Evolution*. 2015, 35, 172-183.
7. Buchanan R.L., Gorris L.G.M., Hayman M.M., Jackson T.C., Whiting R.C. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*. 2017, 75, 1-13.
8. EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*. 2015, 13(1), 3991.
9. EFSA, ECDC. Multi-country outbreak of *Listeria monocytogenes* serogroup IVb, multi-locus sequence type 6, infections linked to frozen corn and possibly to other frozen vegetables – first update. *EFSA Supporting Publication*. 2018, EN-1448.
10. Heredia N., García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition*. 2018, 4, 250-255.
11. Van der Veen S., Abee T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 144, 421-431.
12. Muhterem-Uyar M., Dalmasso M., Sorin Bolocan A., Hernandez M., Kapetanakou A.E., Kuchta T., Manios S.G., Melero B., Minarovičová J., Ioana Nicolau A., Rovira J., Skandamis P.N., Jordan K., Rodríguez-Lázaro D., Stessl B., Wagner M. Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*. 2015, 51, 94-107.
13. CE. Reglamento (CE) nº 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. 2004, L139.
14. Early R. Good agricultural practice and HACCP in fruit and vegetable cultivation. Improving the safety of fresh fruit and vegetables. Woodhead Publishing limited, Cambridge (Reino Unido). 2005.
15. Rodríguez-López P., Bernárdez M., Rodríguez-Herrera J.J., Comesaña A.S., Cabo M.L. Identification and metagenetic characterization of *Listeria monocytogenes*-harbouring communities present in food-related industrial environments. *Food Control*. 2019, 95, 6-17.
16. Kljujev I., Raicevic V., Jovicic-Petrovic J., Vujovic B., Mirkovic M., Rothballer M. *Listeria monocytogenes* – Danger for health safety vegetable production. *Microbial Pathogenesis*. 2018, 120, 23:31.
17. Van Boekel M., Fogliano V., Pellegrini N., Stanton C., Scholz G., Lalljie S., Somoza V., Knorr D., Jasti P.R., Eisenbrand G. A review on the beneficial aspects of food processing. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2010, 54, 1215–1247.
18. Bucur F.I., Grigore-Gurgu L., Crauwels P., Riedel C.U., Nicolau A.I. Resistance of *Listeria monocytogenes* to Stress Conditions Encountered in Food and Food Processing Environments. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9, 2700.
19. Lane D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt, & M. Goodfellow (Eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115–175). Wiley, Chichester (Reino Unido). 1991.
20. Barbosa J., Albano H., Silva C.P., Teixeira P. Microbiological contamination of reusable plastic bags for food transportation. *Food Control*. 2019, 99, 158-163.