



Orientaciones sobre medidas de control de *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes* en alimentos envasados con oxígeno reducido

*M^a Ángeles Martín Linares
Salud Serrano Jiménez*

Elaborado por:

M^a Ángeles Martín Linares, Doctora en Veterinaria. Cuerpo Superior Facultativo de IISS, de la Junta de Andalucía.
Salud Serrano Jiménez. Profesora Titular del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos.
Facultad de Veterinaria. Universidad de Córdoba.

ISBN: 978-84-09-54279-6

Fecha de finalización:
Septiembre 2023

**Orientaciones sobre
medidas de control de
Clostridium botulinum y
Listeria monocytogenes
en alimentos envasados con
oxígeno reducido**

Prólogo

Las enfermedades transmitidas por los alimentos son una de las principales causas de preocupación personal, enfermedad y carga económica. Cada año, muchas personas enferman y algunas mueren por enfermedades transmitidas por los alimentos y, como resultado, el consumidor ha adquirido mayor consciencia y preocupación por la seguridad de los alimentos que ingiere.

Todos los actores que intervienen en la cadena alimentaria (de la granja a la mesa) tienen cierto grado de responsabilidad en la seguridad alimentaria. Los productores y fabricantes tienen la responsabilidad de reducir el riesgo de enfermedades transmitidas por los alimentos en sus operaciones y también los establecimientos minoristas de alimentos tienen obligación de mantener esa garantía de seguridad alimentaria. Por otra parte, la administración del estado debe garantizar esta seguridad a través de sus planes de control recabando información de científicos e investigadores. Por último, es el consumidor el que tiene obligación de exigir la calidad sanitaria de los alimentos que consume y, para ello, deberá mantenerse informado.

En este contexto, y con el ánimo de facilitar el cumplimiento de la normativa por parte de los establecimientos alimentarios surge esta iniciativa innovadora de prevención en Seguridad Alimentaria, por parte de la universidad junto a técnicos de la

administración. Los profesionales veterinarios, por su formación académica, tienen un papel esencial en la elaboración e implementación de políticas de gestión de los riesgos sanitarios protegiendo la sanidad y el bienestar animal o mediante el control de la seguridad alimentaria. También tienen la responsabilidad de liderar la lucha y erradicación de enfermedades epizoóticas y zoonóticas colectivas de gran importancia sanitaria tanto por su propagación, clínica y efectos, como por su repercusión económica. En definitiva, el colectivo veterinario es un eslabón esencial en la Salud Pública.

Es nuestro deseo que estas guías sean de ayuda para el personal encargado de la implantación de programas de higiene, sistemas de Autocontrol o aplicación de principios del análisis de peligros (APPCC) o control de los factores de riesgo en las industrias alimentarias. Esta colección de documentos, con respaldo científico y técnico, propiciará la implementación de los estándares y requisitos de seguridad alimentaria tanto para el cumplimiento de la normativa como para la internacionalización del sector agroalimentario andaluz. Si bien los establecimientos de mayor tamaño podrán beneficiarse a partir de estas pautas, son especialmente los establecimientos pequeños y muy pequeños (grueso del tejido empresarial andaluz) los que pueden obtener información y formación a las que de otro modo no tendrían acceso.

Este es el principal objetivo de esta iniciativa, elaborar y difundir documentos científico técnicos sobre temas de seguridad alimentaria que aúnen recomendaciones técnicas europeas, o

de otros organismos u organizaciones internacionales (*Codex Alimentarius*, Agencias Internacionales de Seguridad Alimentaria, información del Código de Alimentos de la Administración de Alimentos y Medicamentos FDA/USDA) y otros documentos de pautas y conocimientos obtenidos a través de la bibliografía científica que sirvan de orientación como herramientas prácticas y eficaces.

La industria agroalimentaria andaluza constituye una actividad de primera magnitud en la estructura productiva regional. Desde el ámbito académico en unión con el desempeño de la profesión sanitaria y en continuo compromiso con la Salud Pública, perseguimos llevar al más alto nivel la protección de la salud de la población.

Esta colección de guías versa sobre temas de especial interés tanto por su repercusión en la seguridad alimentaria como por las nuevas tendencias de consumo.

Orientaciones sobre medidas de control de *Clostridium botulinum* y *Listeria monocytogenes* en alimentos envasados con oxígeno reducido.

Orientaciones para el control de *Salmonella* en productos de baja humedad listos para el consumo.

Orientaciones para el control de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo.

Orientaciones sobre la validación de las instrucciones de manipulación y cocinado de productos envasados no listos para el consumo.

Principios de Control de los Procesos Térmicos y Evaluación del Cierre de los Envases.

Las autoras



Índice

1. Introducción	9
2. Tecnologías del envasado	11
2.1. <i>Envase en atmósfera modificada</i>	11
2.2. <i>Envasado en atmósferas controladas</i>	11
2.3. <i>Envasado al vacío</i>	12
2.4. <i>Cocinado-enfriado (cook-chill)</i>	12
2.5. <i>Sous-vide</i>	12
3. Principales patógenos de interés	13
3.1. <i>Clostridium botulinum</i>	13
3.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	13
4. Recomendaciones de seguridad alimentaria	15
5. Envasado en oxígeno reducido y refrigeración	17
6. Envasado con oxígeno reducido y una barrera	19
7. Envasado en oxígeno reducido en establecimientos minoristas	21
8. Anexo I	25
Referencias	26



1. Introducción

El envasado con oxígeno reducido puede prolongar la vida útil de ciertos alimentos, aunque este proceso también puede ocasionar graves peligros para la salud pública si no se siguen unas medidas de control adecuadas que eviten el crecimiento de microorganismos patógenos. Estos parámetros de control deben incluir barreras¹ que eviten el crecimiento de microorganismos infecciosos o tóxicos, en combinación con unos controles adecuados de temperatura del producto en todo momento y una rotación cuidadosamente controlada de los alimentos procesados.

El envasado con oxígeno reducido tiene indudables ventajas para la industria alimentaria, tanto desde el punto de vista de la calidad como de la seguridad alimentaria. Previene la contaminación de los alimentos; permite extender la vida útil de un producto mediante la inhibición del crecimiento de bacterias de descomposición aeróbica (generalmente bacterias Gram negativas como *Pseudomonas*, o levaduras y mohos aeróbicos) responsables de los malos olores, y otros cambios en el aspecto o textura que son signos de deterioro. También, al reducir el oxígeno dentro y alrededor de un alimento, se previenen procesos químicos de degradación (retardando el enranciamiento oxidativo de grasas y aceites), oxidativos (previniendo el deterioro del color, por ejemplo, en las carnes crudas, causado por la presencia del oxígeno) y se reduce la deshidratación al evitar la pérdida de agua.

Es por ello, que cada vez con más frecuencia, se está convirtiendo en una práctica habitual no solo en las industrias de fabricación, sino también en establecimientos minoristas (incluida la restauración). Desde el punto de vista de la seguridad alimentaria, el envasado con oxígeno reducido plantea muchas inquietudes de tipo microbiológico con respecto a aquellos microorganismos patógenos que pueden crecer en condiciones de anaerobiosis, *C. botulinum* y *Listeria monocytogenes* (particularmente en los alimentos listos para el consumo (ALC)² refrigerados ya que pueden crecer lentamente a temperaturas cercanas al punto de congelación de los alimentos). Es por ello, que estas prácticas deberían ir siempre acompañadas de una evaluación minuciosa de los peligros potenciales (análisis de peligros), y del establecimiento de unas medidas de control adecuadas.

Los envases permeables al oxígeno deben proporcionar un intercambio de oxígeno suficiente para permitir que los organismos aeróbicos que descomponen de forma natural los productos crezcan y deterioren el producto antes de que la toxina de *C. botulinum* se produzca bajo abuso moderado de temperaturas. Para la Administración Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA), un envase para pescado, que tiene una tasa de transmisión de oxígeno de 10.000 cc/m²/24 horas a 24°C (o más) **se considera permeable al oxígeno y no envasado con oxígeno reducido**.

Nota: Es importante tener en cuenta que se puede formar un entorno de oxígeno reducido dentro de los envases permeables al oxígeno en determinadas circunstancias, como por ejemplo dentro de contenedores profundos, en productos envasados en aceite o productos que se compactan en el envase impidiendo el flujo de oxígeno a través de todo el contenedor.

¹ **Barrera:** un factor de seguridad de naturaleza física, biológica o química, que inhibe o minimiza el crecimiento de microorganismos, incluidos aquellos que pueden ser infecciosos o tóxicos.

² **Alimento listo para el consumo (ALC):** alimento destinado 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.



2. Tecnologías del envasado

El envasado en oxígeno reducido abarca una gran variedad de métodos. Según la clasificación del Food Code. U.S. de la Administración de Alimentos y Medicamentos Americana (FDA), se distinguen los siguientes tipos de envasado:

1. **Atmósferas modificadas** (Modified Atmosphere Packaging por sus siglas en inglés (MAP)).
2. **Atmósferas controladas** (Controlled Atmosphere Packaging por sus siglas en inglés (CAP)).
3. **Al vacío** (vacuum packaging).
4. **Cocinado-enfriado** (cook-chill).
5. **Sous-vide**.

2.1. Envase en atmósfera modificada:

Mediante este método se modifican las composiciones y concentraciones de los componentes del aire que hay dentro del envase. Las atmósferas modificadas se pueden clasificar en los siguientes tipos:

- **Atmósfera inerte.** Se utiliza nitrógeno como gas inerte para llenar envases de productos, principalmente buscando evitar fuerzas mecánicas externas que puedan romper el producto.
- **Atmósfera semi-reactiva.** Utiliza mezclas de gases inertes y reactivos como dióxido de carbono y nitrógeno (CO_2/N_2) o dióxido de carbono, nitrógeno y oxígeno ($\text{CO}_2/\text{N}_2/\text{O}_2$).
- **Atmósfera reactiva.** Usa dióxido de carbono o monóxido de carbono con oxígeno (CO_2 o CO y O_2) para crear ambientes adversos para ciertos microorganismos o para mejorar la calidad del producto. Este a su vez se divide en:
 - **Atmósfera alta en oxígeno,** este cambio es preferible en productos cárnicos para conservar el pigmento estable con la mioglobina y la coloración del producto.
 - **Atmósfera baja en oxígeno,** se utiliza para disminuir el crecimiento de microorganismos que deterioran el producto.

2.2. Envasado en atmósferas controladas:

Es un método en el que se controla la composición de una atmósfera en particular, que pudo haber sido modificada o no antes de sellar el envase. Este tipo de envasado requiere de películas inteligentes y en algunos casos sistemas adicionales que permitan el intercambio de gases de forma selectiva en los momentos en los que la atmósfera del producto está desequilibrándose para que se regule a los límites en los que se previene su deterioro. Las sustancias autorizadas y liberadas como aditivos alimentarios tienen que ajustarse estrictamente a su reglamentación y utilizarse única y exclusivamente bajo las condiciones especificadas en la misma. Las sustancias liberadas como aromas se ajustarán a su propia reglamentación y las sustancias liberadas se considerarán ingredientes alimentarios y estarán sujetos a lo dispuesto en la reglamentación sobre el etiquetado, presentación y publicidad de los productos alimenticios.

2.3. Envasado al vacío:

Es el método en la cual se reduce al mínimo la cantidad de aire del envase tras un sellado hermético.

2.4. Cocinado-enfriado (cook-chill):

Es el proceso en el que el alimento cocinado a altas temperaturas se envasa aún en caliente en bolsas impermeables de las que se extrae el aire, y después se sellan o cierran herméticamente y se enfrían de inmediato para mantenerse en temperaturas de refrigeración o congelación. La cocción reduce la carga microbiana e inactiva enzimas que provocan el deterioro del producto.

2.5. Sous-vide:

Es el proceso en el cual el producto crudo o parcialmente cocinado se envasa al vacío y se cocina bajo unas condiciones controladas de tiempo/temperatura. Se ha de enfriar rápidamente y se debe almacenar a temperaturas de refrigeración o congelación para inhibir el crecimiento de patógenos psicrotróficos.



3. Principales patógenos de interés

3.1. *Clostridium botulinum*

Clostridium botulinum es el agente causal del botulismo, una intoxicación alimentaria grave caracterizada por visión doble, parálisis y ocasionalmente la muerte. El microorganismo es una bacteria anaeróbica formadora de esporos que produce una potente neurotoxina. El microorganismo y sus esporos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Se encuentran tanto en suelos cultivados como forestales; sedimentos del fondo de arroyos, lagos y aguas costeras; en el tracto intestinal de peces, crustáceos y mamíferos. En estado esporulado, es muy resistente al calor, aunque las células vegetativas de todos los tipos de *C. botulinum* mueren fácilmente mediante tratamientos térmicos de pasterización. Los esporos del grupo proteolítico son mucho más resistentes al calor que las del grupo no proteolítico, y requieren un proceso a más de 121°C (conservas) para ser destruidos.

Las cepas de *C. botulinum* se pueden dividir en dos grupos, el grupo proteolítico (es decir, las que descomponen las proteínas) que incluye el tipo A (generalmente se encuentra en tierra) y algunos de los tipos B y F, y el grupo no proteolítico (es decir, las que no descomponen las proteínas) que incluye el tipo E, que es la forma más común presente en los ambientes marinos y de agua dulce y algunos de los tipos B y F. Debido a que se sabe que los esporos están presentes en las vísceras, cualquier producto que se vaya a conservar mediante salazón, secado, encurtido y fermentación debe provenir del animal eviscerado antes del procesamiento. Sin la evisceración, es posible que se produzca la formación de la toxina durante el proceso, incluso con un estricto control de la temperatura.

La temperatura mínima para el crecimiento y la formación de la toxina por el tipo E de *C. botulinum* y los tipos B y F no proteolíticos es 3,3°C. Para el tipo A y los tipos B y F proteolíticos, la temperatura mínima de crecimiento es 10°C. La formación de toxina por *C. botulinum* es más rápida cuando las temperaturas son más elevadas. A medida que aumenta la vida útil de los alimentos refrigerados, hay más tiempo disponible para el crecimiento de *C. botulinum* y la formación de la toxina y conforme aumenta la temperatura, el tiempo necesario para la formación de la toxina se reduce considerablemente.

Prácticamente cualquier tipo de alimento que no sea muy ácido (pH igual o superior a 4,6) puede favorecer el crecimiento y la producción de toxinas por *C. botulinum*. Se necesita una concentración de sal del 4% al 5% para la inhibición de sus esporos (especialmente en el caso del tipo E), y una concentración del 5% para inhibir completamente su crecimiento. Hay una gran variedad de alimentos envasados, como el maíz, pimientos, judías verdes, sopas, remolacha, espárragos, champiñones, aceitunas, espinacas, atún, pollo, paté de hígado, fiambres, jamón, salchicha, berenjena rellena, langosta y el pescado ahumado y salado, que se han asociado con la toxina botulínica.

3.2. *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes es un patógeno ambiental que puede contaminar los alimentos y causar una enfermedad leve no invasiva (llamada gastroenteritis listerial) o una enfermedad grave e invasiva (llamada listeriosis). La listeriosis se caracteriza por una tasa de mortalidad relativamente alta en comparación con las enfermedades causadas por la mayoría de los otros patógenos transmitidos por los alimentos (~ 20% en comparación con <1% para *Salmonella* o *E. coli* O157). Las personas que tienen el mayor riesgo de padecer listeriosis debido al consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* son las mujeres embarazadas y sus fetos, los ancianos y todas aquellas personas con un sistema inmune debilitado.

L. monocytogenes está muy extendida en el medio ambiente. Se encuentra en el suelo, agua, aguas residuales y vegetación en descomposición (ensilaje). Se puede aislar fácilmente en seres humanos, animales domésticos, productos agrícolas crudos y en el ambiente de los establecimientos de procesamiento y envasado de alimentos (particularmente en áreas húmedas y frías). Se ha demostrado además que *L. monocytogenes* persiste en el equipo y el entorno de procesamiento en sitios de refugio o nichos donde es muy difícil que actúen los desinfectantes de uso habitual.

L. monocytogenes puede sobrevivir en condiciones ambientales adversas durante mucho más tiempo que otras muchas bacterias vegetativas patógenas. Además de poder sobrevivir y multiplicarse lentamente a temperaturas de refrigeración, *L. monocytogenes* tolera altas concentraciones de sal y sobrevive al almacenamiento en congelación durante prolongados períodos de tiempo. Sobrevive también a condiciones ácidas y es más resistente al calor que muchos otros patógenos transmitidos por los alimentos que no forman esporos, aunque puede eliminarse mediante procedimientos de calentamiento no muy elevados, por ejemplo, los utilizados para pasteurizar la leche. Se recomiendan tratamientos térmicos de al menos 70°C durante 2 minutos o tratamiento equivalente para conseguir 6 reducciones decimales de *Listeria monocytogenes*.

La listeriosis se asocia en gran medida con los alimentos listos para el consumo (ALC). Los alimentos que presentan el mayor riesgo de transmitirla son aquellos alimentos ALC que tienen características intrínsecas (como el pH y la actividad agua) que favorecen el crecimiento de *L. monocytogenes*, mientras que los alimentos ALC que presentan un menor riesgo de transmisión alimentaria de listeriosis, son aquellos alimentos que tienen características intrínsecas que impiden el crecimiento de *L. monocytogenes*. Está bien establecido que *L. monocytogenes* no crece cuando:

- El pH del alimento es $\leq 4,4$
- La actividad agua de los alimentos es $\leq 0,92$
- Productos con un pH $\leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$
- Productos con una vida útil inferior a 5 días
- El alimento está formulado para contener una combinación de factores científicamente demostrados como eficaces para prevenir el crecimiento (p.ej. se pueden usar sorbatos o benzoatos en combinación con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido láctico y ácido cítrico).

Hay otras bacterias patógenas como *Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* que pueden estar presentes en los alimentos pasteurizados, ya que pueden sobrevivir a dichos tratamientos. Otros patógenos psicrotrofos, como *Yersinia enterocolitica* pueden ser también de riesgo si no se toman medidas de control como son:

- Tratamiento térmico adecuado
- Rapidez en el enfriamiento
- Condiciones de almacenamiento en refrigeración, temperatura (1-4°C) y tiempo.

En el anexo I se incluye una tabla con las condiciones limitantes en el crecimiento de los principales patógenos.

4. Recomendaciones de seguridad alimentaria

Existen varias estrategias en general para el control de patógenos:

- controlar la fuente, el origen de donde provienen, si son proveedores aprobados que cumplen los principios y reglamentos de seguridad alimentaria.
- controlar el nivel de acidez (pH) en el producto.
- controlar la cantidad de tiempo que el alimento está expuesto a temperaturas favorables para el crecimiento de bacterias patógenas y la producción de toxinas.
- controlar la cantidad de sal o conservantes, como el nitrito de sodio, en el producto.
- controlar la cantidad de humedad disponible para el crecimiento de bacterias patógenas (actividad de agua) en el producto durante la formulación.
- controlar la cantidad de humedad que está disponible para el crecimiento de bacterias patógenas (actividad de agua) en el producto durante el secado.
- eliminar bacterias patógenas mediante la cocción o pasteurización o conservas (envases cerrados herméticamente).
- controlar la introducción de bacterias patógenas después del proceso de pasteurización y después del proceso de cocción realizado inmediatamente antes del envasado con oxígeno reducido.



5. Envasado en oxígeno reducido y refrigeración

La principal barrera del envasado con oxígeno reducido es la refrigeración. Son pocos los tratamientos que de manera eficaz destruyen todos los microorganismos patógenos en los alimentos, a excepción de la esterilización con calor y la irradiación. Otros factores inhibidores usados en combinación con la refrigeración pueden ser igualmente eficaces en la prevención del deterioro y crecimiento de patógenos causantes de enfermedades transmitidas por alimentos.

Si la única barrera de control en alimentos envasados con oxígeno reducido es la refrigeración, las temperaturas de almacenamiento refrigerado $\leq 4^{\circ}\text{C}$ pueden ser adecuadas para prevenir el crecimiento y/o la producción de toxinas de algunos microorganismos patógenos, pero *C. botulinum* no proteolíticos y *L. monocytogenes* pueden multiplicarse muy por debajo de los $\leq 4^{\circ}\text{C}$. Por esta razón son los patógenos de mayor riesgo. El control de su crecimiento controlará también el crecimiento de otros patógenos transmitidos por los alimentos.

El tiempo/temperatura se convierte en el factor de control crítico para el crecimiento de *C. botulinum* y *L. monocytogenes*. Los esporos no proteolíticos de *C. botulinum* pueden germinar y producir toxinas a temperaturas de hasta 3°C . Por lo tanto, mantener los alimentos a $T_{\text{a}} \leq 3^{\circ}\text{C}$ debería prevenir la formación de la toxina de *C. botulinum*. *L. monocytogenes* puede crecer, aunque muy lentamente, a temperaturas de hasta -1°C . La fase de retraso y el tiempo de generación de ambos patógenos se acortan a medida que aumenta la temperatura de almacenamiento.

Sin embargo, la experiencia muestra que tales temperaturas bajas no siempre se pueden garantizar durante la distribución, exposición y venta minorista, y durante el transporte, almacenamiento y uso por parte del consumidor (Conner *et al.*, 1989). Por tanto, la baja temperatura no debe utilizarse como única medida de control para garantizar la seguridad en aquellas situaciones en las que no se puedan garantizar y demostrar temperaturas inferiores a 3°C a lo largo de la cadena de frío.

El uso de un indicador de temperatura y tiempo (TTI) en cada envase puede ser un medio apropiado para garantizar que, durante el almacenamiento y la distribución de estos productos, se ha mantenido la cadena de frío por debajo de los $3,3^{\circ}\text{C}$. Mediante el uso de estos dispositivos se supervisa el tiempo y la temperatura de exposición del envase y alerta al consumidor final (por ejemplo, mediante un cambio de color) si se ha producido una exposición insegura del tiempo y la temperatura que puede originar la formación de toxina de *C. botulinum*. Estos dispositivos se deben validar para asegurar que son adecuados para el propósito previsto y se debe verificar su funcionamiento en el momento de usarlo. El etiquetado en este tipo de productos tal y como establece el Reglamento (CE) N^o 1169/2011 (art. 9) debe indicar las condiciones especiales de conservación ya que, en estos alimentos, la refrigeración o la congelación actúan como una barrera de seguridad.



6. Envasado con oxígeno reducido y una barrera

Los tratamientos térmicos aplicados a los alimentos cocinados al vacío oscilan entre 65°C y 95°C durante 10 a 60 minutos. Después del tratamiento térmico, los productos han de enfriarse rápidamente, manteniéndose a temperaturas de refrigeración (1-4°C) hasta calentarse antes de su consumo. Se recomienda para los productos con una vida útil superior a los 8 días (Sous Vide Advisory Committee), tratamientos térmicos que consigan alcanzar 6 reducciones decimales de esporos de *C. botulinum* tipo E (90°C durante 4,5 minutos). La European Chilled Food Federation, recomienda tratamientos térmicos más severos (90°C durante 10 minutos o tratamiento equivalente) ya que las cepas de *C. botulinum* proteolítico son más resistentes al calor que las de tipo no proteolítico E.

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que los datos existentes en la bibliografía científica acerca de la termorresistencia de los microorganismos patógenos se obtienen en medios de cultivo y hay que tener en cuenta cómo influyen los factores intrínsecos de los alimentos (a_w , pH, contenido en grasa...) en el crecimiento o inactivación de los microorganismos y en la termorresistencia de estos, a fin de establecer barreras adicionales a la refrigeración.

Si el tratamiento térmico aplicado no produce esterilidad comercial (ahumado o pasterización) y el procesado del alimento no implica barreras secundarias alternativas ($\text{pH} \leq 4,6$, $a_w \leq 0,91$, % de sal de la fase acuosa, conservantes (nitratos y/o nitritos)) para prevenir el crecimiento de *C. Botulinum* no proteolítico, el alimento requiere refrigeración por debajo de 3,3°C para evitar la germinación de esporos y la formación de toxinas y así garantizar la seguridad del producto.

Nota: La evidencia científica respalda que los alimentos envasados en oxígeno reducido, mantenidos a $\leq 5^\circ\text{C}$ (≤ 48 horas) no se considerarían un peligro potencial para *Clostridium botulinum* ni para *Listeria monocytogenes*.

Imaginemos un producto, como por ejemplo cangrejos cocidos. El tratamiento térmico es realizado antes de colocar el producto en el recipiente del producto terminado, que luego se va a distribuir refrigerado. Tanto *Clostridium botulinum* como *Listeria* es probable que estén presentes en la carne de cangrejo cruda, pero si el envase es permeable al oxígeno, el patógeno objetivo³ va a ser *Listeria*. Una pasteurización convencional sería adecuada para eliminar el patógeno, sin embargo, dado que el producto va a estar expuesto al medio ambiente antes del envasado, se necesitan estrictas medidas de higiene para evitar que *Listeria* vuelva a contaminar el producto después de la cocción.

Los alimentos fabricados y procesados (por ejemplo, tratados térmicamente) en un recipiente hermético, pueden contaminarse después del tratamiento si el recipiente tiene una fuga o pierde la integridad del cierre, exponiendo así los alimentos procesados a peligros biológicos. Los principales patógenos de interés incluyen *C. botulinum*, *L. monocytogenes*, cepas patógenas de *E. coli*, *Salmonella* spp., *S. aureus* y *B. cereus*.

Las principales causas de la recontaminación de los alimentos después de un paso de control del proceso y el envasado son los cierres defectuosos o mal formados de los contenedores y el agua de refrigeración contaminada. Este riesgo es una preocupación en particular durante el enfriamiento de envases realizado en un baño de agua. A medida que el producto se enfría, se crea vacío en el recipiente y el agua de refrigeración contaminada puede entrar a través del cierre del recipiente, especialmente si el cierre está defectuoso.

3 Un patógeno objetivo en cualquier proceso térmico es el patógeno de importancia para la salud pública más resistente al calor, que es razonablemente probable que se presente en el producto.



7. Envasado en oxígeno reducido en establecimientos minoristas

Es práctica habitual en muchos comercios al por menor, en respuesta a la demanda de los consumidores, el loncheado y envasado al vacío de productos cárnicos tales como el jamón cocido o serrano, chorizo, salchichón, lomo, o quesos. Esta práctica se realiza sin tener en cuenta un análisis de peligros y puntos críticos de control tal y como establece el Reglamento (CE) 852/2004, de 29 de abril relativo a la higiene de los productos alimenticios.

Estos alimentos listos para el consumo, aun cuando se hayan sometido a un paso de cocción adecuado para eliminar *L. monocytogenes*, se pueden volver a contaminar cuando se abre el envase, se cortan y se vuelven a envasar al por menor. Si la refrigeración es la única barrera para garantizar la seguridad del producto, se requieren controles de temperatura muy rigurosos y se debería mantener una temperatura $\leq 3,3^{\circ}\text{C}$ en todo momento, para evitar la proliferación de *C. botulinum* y la posterior producción de toxina. El mantenimiento de la temperatura por debajo de los $3,3^{\circ}\text{C}$ a lo largo de la cadena de almacenamiento y distribución es difícil. Los consumidores a menudo no pueden, o no mantienen, una refrigeración adecuada de los alimentos potencialmente peligrosos en el hogar. En el mejor de los casos, se puede esperar que los frigoríficos domésticos o de los establecimientos de restauración, oscilen entre 5° y 10°C . Por lo tanto, no se puede confiar en la refrigeración por sí sola para garantizar la seguridad microbiológica después de que los alimentos se hayan envasado con oxígeno reducido. *Listeria monocytogenes*, además, puede crecer a temperaturas aún más bajas y, en consecuencia, se deben establecer fechas de caducidad adecuadas.

Teniendo en cuenta las recomendaciones científico técnicas establecidas en el Food Code (2022) Food and Drugs Administration de Estados Unidos (FDA), los establecimientos alimentarios que envasen alimentos en una atmósfera de oxígeno reducido deben asegurar unas prácticas higiénicas adecuadas que incluyen:

- No mantener contacto con las manos en los alimentos ALC (uso de utensilios, pinzas, o guantes desechables. Los guantes desechables deberán cambiarse cuando queden contaminados, cuando se ensucien o se rompan, cuando se cambie de alimentos crudos a cocinados o bien cuando el trabajador abandone el área de preparación de la comida o cambie de actividad. Es necesario también cambiarlos a menudo para reducir al mínimo el aumento de la transpiración y de las bacterias en el interior del guante).
- El envasado se debe realizar en un área específicamente designada para este propósito. Debe haber una separación eficaz para evitar la contaminación cruzada entre alimentos crudos y cocidos.
- El acceso al equipo de procesamiento debe estar restringido al personal capacitado que esté familiarizado con los peligros potenciales de la operación
- Deben estar implantados unos procedimientos de limpieza y desinfección adecuados tanto en superficies de contacto como ambientales.

Deben, además, desarrollar un Plan de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), que incluya:

- Identificación de los alimentos que se envasan al vacío
- Una descripción completa de los procedimientos de procesamiento, envasado y almacenamiento designados como puntos críticos de control, con los correspondientes límites críticos, planes de acciones correctivas, vigilancia, verificación y

registros

- Equipos y ficha técnica de los materiales de envasado (permeabilidad o no al oxígeno etc.). Los envases, al igual que todos los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos han de cumplir el Reglamento (CE) Nº 1935/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 2004, sobre los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con alimentos.
- Lista y proporción de gases de calidad alimentaria utilizados, en su caso.
- Una descripción del sistema de trazabilidad.
- Una descripción del programa de formación de empleados en técnicas de envasado en oxígeno reducido y peligros potenciales inherentes a los alimentos envasados al vacío.
- Justificación de la vida útil de los productos envasados al vacío mediante estudios de vida útil tal y como se establece en Art 1 y 3.2 del Reglamento (CE) Nº 2073/2005, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios.
- **Pescado (crudo o cocido):** A excepción del pescado que se congela antes, durante y después del envasado, un establecimiento minorista de alimentos **no debe envasar** pescado en oxígeno reducido debido a la asociación natural de estos productos con *C. botulinum* no proteolítico (principalmente tipo E) que crece a $\leq 3^{\circ}\text{C}$.
- El pescado que se congela debe estar etiquetado: **“Mantener congelado hasta el momento de uso”**.
- **Quesos:** Limitar el envasado de quesos a aquellos que se fabrican comercialmente (de pasta dura, semiblandos o procesados pasteurizados) y sin ingredientes adicionales agregados en el establecimiento minorista. **No deben envasarse** en oxígeno reducido en establecimientos minoristas los quesos blandos tipo Camembert, Brie, Ricotta, Cottage... ...(>69% de humedad sin materia grasa según CODEX), debido a su capacidad para favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* en condiciones de atmósfera modificada.
- Para alimentos envasados al vacío **tras el loncheado** (generalmente de fiambres) o quesos, en los establecimientos de venta al por menor, el Food Code de la Administración Americana de Alimentos y Medicamentos (FDA), establece los siguientes límites críticos:
 - $\leq 4^{\circ}$ **más**, al menos, una barrera secundaria **un máximo 30 días de vida útil***

*deben cumplir además de la refrigeración $\leq 5^{\circ}\text{C}$, al menos alguna de las siguientes **barreras secundarias**:

- pH o acidez de $\leq 4,6$
- Actividad del agua (a_w) $\leq 0,91$
- Productos deshidratados
- Altas concentraciones de sal 4% o 5%
- Conservantes (por ejemplo, nitratos y/o nitritos que inhiben la germinación de esporos y la producción de toxinas por *Clostridium botulinum*)
- Es un alimento que se conserva congelado

El producto ha de ser etiquetado con:

- Mantenga el producto a temperatura $\leq 4^{\circ}\text{C}$
- Desechar tras 30 días después de su envasado

Los productos envasados han de mantenerse en un equipo frigorífico que esté equipado con un sistema electrónico que vigile continuamente el tiempo y la temperatura y se examine visualmente para su correcto funcionamiento al menos dos veces al día, y han de estar etiquetados con el nombre del producto y la fecha de envasado.

El Comité Científico de AESAN, ha elaborado un informe en el que evalúa la vida útil, en relación con *Listeria monocytogenes*, de determinados productos (quesos, productos cárnicos cocidos (incluidos patés) y productos cárnicos curados) fraccionados o loncheados y envasados (al vacío o no) antes de la venta en el establecimiento de comercio al por menor. Además, evalúa el riesgo potencial por presencia de *Clostridium botulinum* en estos alimentos, y, adicionalmente, se estudia el riesgo por virus entéricos.

Según dicho informe (AESAN-2023-004) la vida útil admisible para los derivados cárnicos cocidos (como el jamón cocido o la paletilla cocida) almacenados a 4°C con niveles de a_w igual o superior a 0,995 y pH igual o superior a 6,71 (condiciones más desfavorables evaluadas) es, como máximo, de 5 días tanto para los productos envasados al aire como en atmósferas reducidas de oxígeno. En aquellas formulaciones con valores inferiores de pH (6,1-6,5) y a_w (0,974) se pueden mantener durante 10 días a 4°C o 3 días a 8°C. Por último, los productos con baja a_w (0,968) y pH (6,1) pueden mantenerse durante 25 días y 19 días a temperaturas de 4 y 8°C, respectivamente.

Para patés fraccionados, envasados al aire y almacenados a 4°C, con valores de a_w igual o superior a 0,988 y pH igual o superior a 6,5, la vida útil admisible es como máximo, de 6 días. Los productos con formulaciones de a_w más limitantes para el crecimiento microbiano (0,979) pueden mantenerse durante 10 días a 4°C, mientras que aquellos patés con a_w (0,971) pueden almacenarse a 4°C durante un tiempo de 25 días, o a 8°C durante 7 días.

Para aquellos quesos frescos (tipo Burgos) o con maduraciones cortas, inferiores a 2 semanas (quesos tiernos) recomiendan se almacenen a 4°C durante un tiempo aproximado de 8-9 días. En el caso de quesos fraccionados o loncheados, con un periodo de maduración mínimo de 2 semanas e inferior a 2 meses, almacenados a 4°C, la vida útil admisible es, como máximo, de 10 días, tanto para los productos conservados al aire como en atmósferas reducidas de oxígeno. Otras tipologías de quesos con tiempos de maduración intermedios (5 semanas) como los quesos semicurados podrían almacenarse a 4°C durante 15-20 días, o a 8°C durante 6 días. Por último, aquellos quesos con 8 semanas de maduración, debido al descenso en la a_w , permiten un almacenamiento de 25 días a 4°C y 8°C, mientras que a 22°C pueden conservarse durante un tiempo de 9-10 días.

Aquellos productos con unos valores de a_w y pH que limitan el crecimiento de *L. monocytogenes* (como el jamón curado, el chorizo, el salchichón o los quesos de maduración superior a 2 meses) se pueden conservar a temperatura ambiente.

Finalmente, la vida útil en productos en los que pueda estar presente *C. botulinum* con condiciones favorables a su crecimiento debería ser de 11 días si se garantiza una temperatura de refrigeración de 5°C, y de 4 días si se garantiza una temperatura igual o inferior a 8°C.

En el caso de los establecimientos minoristas de restauración que utilizan procesos como el **cocinado-enfriado (cook-chill)** o el **Sous-vide**, la FDA establece que deben tener un sistema de Análisis de Peligros y Control de Puntos Críticos que garantice que el alimento:

- se prepara y se consume en las instalaciones.
- se cocina hasta que todas las partes del alimento se calienten a la temperatura exigida en el APPCC.
- está protegido de toda contaminación antes y después de cocinarse.
- se coloca en el envase y se cierra antes de ser cocinado (**Sous-vide**), o se coloca en el envase y se cierra inmediatamente después de ser cocinado y antes de que alcance una temperatura interna inferior a 57°C (**cook-chill**).
- se enfría a 5°C en el envase sellado y se enfría a 1°C dentro de las 48 horas después de haber alcanzado los 5°C y se mantiene a esa temperatura hasta que se consuma dentro de los 30 días después de la fecha de envasado o
 - se mantiene a temperatura $\leq 5^\circ\text{C}$ durante no más de 7 días, tiempo en el cual el alimento deberá consumirse; o
 - se mantiene congelado sin restricción de vida útil mientras esté congelado hasta su consumo o su uso.
- se mantiene en un equipo de refrigeración que esté equipado con un sistema electrónico que controla constantemente la hora y la temperatura y esta es verificada visualmente dos veces al día para comprobar que funciona adecuadamente.
- está etiquetado con el nombre del producto y la fecha de envasado.
- se mantienen los registros necesarios para confirmar que los parámetros de tiempo /temperatura de refrigeración y mantenimiento en frío que se requieren como parte del Plan APPCC.

Con respecto al tratamiento térmico aplicado, éste va a depender en función de la vida útil que se le dé al producto.

Vida útil corta

Alimentos de vida útil corta han de recibir tratamientos térmicos suficientes para inactivar patógenos vegetativos, por ejemplo, una reducción de seis decimales de *Listeria monocytogenes*, que se puede lograr a 70°C durante 2 min o un proceso de calor de letalidad equivalente asumiendo un valor z de 6-7,4°C (Gaze *et al.*, 1989), o reducción de ocho decimales, lograda mediante un proceso de 2 minutos a 72°C (Mossel y Struijk, 1991).

Sin embargo, estos procesos térmicos son insuficientes para inactivar sustancialmente los esporos de cepas psicrotróficas de

C. botulinum (pueden en realidad seleccionar *C. botulinum* destruyendo a los microorganismos competidores). El alimento requiere refrigeración por debajo de 3,3°C para evitar la germinación de esporos no proteolíticos y la formación de toxinas y garantizar la seguridad del producto (un trabajo más reciente ha demostrado que, en determinadas circunstancias, es posible un crecimiento lento a la temperatura ligeramente más baja de 3,0 °C (Graham *et al.*, 1997). Por esta razón, los productos al vacío se congelan con frecuencia y se almacenan en congelación hasta su uso. Sin embargo, la experiencia demuestra que no siempre se pueden garantizar temperaturas tan bajas durante la distribución, exhibición y venta minorista, y durante el transporte, almacenamiento y uso por parte del consumidor (Conner *et al.*, 1989). Por lo tanto, la temperatura baja no debe utilizarse como única medida de control para garantizar la seguridad.

Información existente de estudios de microbiología predictiva a partir de Food MicroModel, para productos con pH casi neutro y una alta actividad de agua que no reciben un proceso de calor suficiente para producir seis reducciones decimales⁴ de esporos de *C. botulinum*, indica que la vida útil máxima no debe exceder los 10 días a 5°C, 5 días a 7°C o 4 días a 8°C, a menos que se demuestre que hay factores de conservación adicionales que ofrecen una garantía de seguridad y se demuestra que son efectivos (por ejemplo, tratamiento térmico, composición de los alimentos, etc.) (Gould, 1999).

Si se administran tratamientos térmicos más suaves se debe proporcionar evidencia mediante estudios predictivos o ensayos de desafío de que otros factores conservantes o combinaciones de los que están presentes y en funcionamiento (por ejemplo, pH inferior a 5,0, una actividad del agua inferior a 0,97 o una concentración de sal en fase acuosa de más del 3,5%, control fiable de la temperatura por debajo de 3°C, etc.) y la vida útil suficientemente corta, inhiben el crecimiento de los esporos supervivientes.

Vida útil larga

Se recomiendan para los productos con una vida útil superior a los 5 días (Sous vide Advisory Committee), tratamientos térmicos que consigan alcanzar 6 reducciones decimales de esporos de *C. botulinum* tipo E (90°C durante 4,5 minutos). La European Chilled Food Federation recomienda tratamientos térmicos más severos (90°C durante 10 minutos o tratamiento equivalente) ya que las cepas de *C. botulinum* tipo B son más resistentes al calor que las de tipo E.

Para los productos que están destinados a tener una vida útil prolongada, se considera que la inactivación de los esporos de *C. botulinum* psicrotrófico en al menos seis reducciones decimales garantiza la seguridad, siempre que la temperatura se mantenga por debajo de aquella a la que pueden crecer las cepas mesófilas de *C. botulinum* proteolítico (10°C), durante el almacenamiento, distribución, venta minorista y almacenamiento.

Si se dan tratamientos térmicos más suaves que un equivalente de 90°C, 10 minutos, se debe proporcionar evidencia de que otros factores conservantes o combinaciones de estos están operando para inhibir el crecimiento de los esporos supervivientes. Por ejemplo, los factores conservantes pueden emplearse individualmente, como un valor de pH inferior a 5,0, una actividad de agua inferior a 0,97 o una concentración de sal en agua superior al 3,5 %.

La lisozima aumenta la aparente resistencia al calor de los esporos de cepas psicrotróficas de *C. botulinum* (Scott y Bernard, 1985; Peck *et al.*, 1992). El efecto es significativo, y generaría dudas considerables sobre la solidez del proceso de calor mínimo a 90 °C si ocurriera en los alimentos (Peck y Fernández, 1995).

Por lo tanto, se requiere urgentemente más información, particularmente sobre los efectos de la lisozima que está presente en muchos alimentos (Proctor y Cunningham, 1988) y sobre los alimentos que contienen enzimas con actividad similar a la lisozima. Esta información es necesaria para los procedimientos que emplean procesos de letalidad equivalentes a 90°C, 10 minutos, y particularmente para procesos sustancialmente por debajo de estos parámetros, durante los cuales se espera que la supervivencia de la actividad de la lisozima sea más probable, y a temperaturas de recuperación relevantes para las prácticas de almacenamiento de alimentos.

4 El argumento de que una reducción de seis decimales, en lugar de un mayor (o menor) nivel de inactivación, es satisfactoria, es generalmente aceptado sobre la base de que: (1) se ha estimado que la presencia de esporos de *C. botulinum* es baja en muchos alimentos. (2) Aunque se estima a partir de experimentos con un número limitado de cepas, el logro de la reducción de seis decimales se basa en mediciones de las resistencias al calor de las cepas de organismos más tolerantes al calor (Gaze y Brown, 1990; Shellekens y Martens, 1992 ; Lund y Notermans, 1993).

8. Anexo I

Tabla de condiciones limitantes para el crecimiento de patógenos

TABLE A-1. LIMITING CONDITIONS FOR PATHOGEN GROWTH

PATHOGEN	MIN. A_w (USING SALT)	MIN. pH	MAX. pH	MAX. % WATER PHASE SALT	MIN. TEMP.	MAX. TEMP.	OXYGEN REQUIREMENT
BACILLUS CEREUS	0.92	4.3	9.3	10	39.2° F 4° C	131° F 55° C	facultative anaerobe ⁴
CAMPYLOBACTER JEJUNI	0.987	4.9	9.5	1.7	86° F 30° C	113° F 45° C	microaerophile ²
CLOSTRIDIUM BOTULINUM, TYPE A, AND PROTEOLYTIC TYPES B AND F	0.935	4.6	9	10	50° F 10° C	118.4° F 48° C	anaerobe ³
CLOSTRIDIUM BOTULINUM, TYPE E, AND NONPROTEOLYTIC TYPES B AND F	0.97	5	9	5	37.9° F 3.3° C	113° F 45° C	anaerobe ³
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	0.93	5	9	7	50° F 10° C	125.6° F 52° C	anaerobe ³
PATHOGENIC STRAINS OF ESCHERICHIA COLI	0.95	4	10	6.5	43.7° F 6.5° C	120.9° F 49.4° C	facultative anaerobe ⁴
LISTERIA MONOCYTOGENES	0.92	4.4	9.4	10	31.3° F -0.4° C	113° F 45° C	facultative anaerobe ⁴
SALMONELLA SPP.	0.94	3.7	9.5	8	41.4° F 5.2° C	115.2° F 46.2° C	facultative anaerobe ⁴
SHIGELLA SPP.	0.96	4.8	9.3	5.2	43° F 6.1° C	116.8° F 47.1° C	facultative anaerobe ⁴
STAPHYLOCOCCUS AUREUS GROWTH	0.83	4	10	20	44.6° F 7° C	122° F 50° C	facultative anaerobe ⁴
STAPHYLOCOCCUS AUREUS TOXIN FORMA- TION	0.85	4	9.8	10	50° F 10° C	118° F 48° C	facultative anaerobe ⁴
VIBRIO CHOLERAE	0.97	5	10	6	50° F 10° C	109.4° F 43° C	facultative anaerobe ⁴
VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS	0.94	4.8	11	10	41° F 5° C	113.5° F 45.3° C	facultative anaerobe ⁴
VIBRIO VULNIFICUS	0.96	5	10	5	46.4° F 8° C	109.4° F 43° C	facultative anaerobe ⁴
YERSINIA ENTEROCOLITICA	0.945	4.2	10	7	29.7° F -1.3° C	107.6° F 42° C	facultative anaerobe ⁴

1. Tiene un crecimiento significativamente retardado (> 24 horas a 55°C).
2. Requiere niveles limitados de oxígeno.
3. Requiere la ausencia de oxígeno.
4. Crece con o sin oxígeno.

Fuente: Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition. June 2022. Department of Health and Human Services Public Health Service Food and Drug Administration.

Referencias

1. Anon. Chill and Frozen: Guidelines on Cook-Chill and Cook-Freezing Catering Systems. 1989. HMSO, London.
2. Conner DE, Scott VN & Bernard DT. Potential *Clostridium botulinum* hazards associated with extended shelf-life refrigerated foods: a review. *Journal of Food Safety* 1989, 10, 131-153.
3. Food Code. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service. Food and Drug Administration. pp 624. 2017. <https://www.fda.gov/media/110822/download>.
4. Association of Food and Drug Officials. Retail Guidelines - Refrigerated Foods in Reduced Oxygen Packages. *J. Assoc. Food Drug Offic.* 1990, 54(5), 80-84.
5. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance Fourth Edition. June 2021. Department of Health and Human Services Public Health Service Food and Drug Administration.
6. Gaze JE, Brown GD, Gaskell DE & Banks JG. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenates of chicken, beef steak and carrot. *Food Microbiology* 1989, 6, 251-259.
7. Gaze JE & Brown GD. Determination of the heat resistance of a strain of *Clostridium botulinum* type B and a strain of type E, heated in cod and carrot homogenate over the temperature range 70 to 90°C. Campden Food and Drink Research Technical Memorandum 1990, Nº. 592.
8. Gould GW, *Sous vide* foods: conclusions of an ECFF Botulinum Working Party, *Food Control*, 1999, 10 (1).
9. Graham AF, Mason DR, Maxwell FJ & Peck M W. Effect of pH and NaCl on growth from spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* at chill temperatures. *Letters in Applied Microbiology* 1997, 24, 95-100.
10. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el establecimiento de la vida útil de determinados alimentos listos para el consumo loncheados o cortados y envasados antes de la venta en establecimientos de comercio al por menor AESAN-2023-004 nº37, pp: 153-186.
11. Lund BM & Nottermans SHW. Potential hazards associated with REPFEDs (refrigerated, processed foods of extended durability). In: *Clostridium botulinum* Ecology and Control in Foods. A. H. W. Hauschild, & K. L. Dodds (eds.). Marcel Dekker, New York, 1993, pp. 379-403.
12. Mossel DA & Struijk CB. Public health implications of refrigerated pasteurised ('*sous-vide*') foods. *International Journal of Food Microbiology* 1991, 13, 187-206.
13. Shellekens W & Martens T. '*Sous Vide*' Cooking, Part 1: Scientific Literature Review CEC Publ. 1992, Nº. EUR 15018
14. Skinner GE y JW. Larkin. Conservative prediction of time to *Clostridium botulinum* toxin formation for use with time-temperature indicators to ensure the safety of foods. *J. Food Prot.* 1998, 61, 1154-1160.
15. Refrigerated Foods and Microbiological Criteria Committee of the National Food Processors Association (Comité de Alimentos Refrigerados y Criterios Microbiológicos de la Asociación Nacional de Procesadores de Alimentos). Safety considerations for new generation refrigerated foods. *Dairy Food Sanit.* 1988, 8, 5-7.
16. Peck MW. *Clostridium botulinum* and the safety of refrigerated processed foods of extended durability. *Trends Food Sci. Technol.* 1997, 8, 186-192.
17. Scott VN & Bernard DT. The effect of lysozyme on the apparent heat resistance of non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*. *Journal of Food Safety* 1985, 7, 145-154.
18. Sobel J, Tucker N, Sulka A, et al. Foodborne Botulism in the United States, 1990-2000. *Emerging Infectious Diseases* 2004, 10(9), 1606-1611.
19. Peck M W, Fairbairn DA & Lund BM. The effect of recovery medium on the estimated heat-inactivation of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Letters in Applied Microbiology* 1992, 15, 146-151.
20. Peck MW & Fernandez PS. Effect of lysozyme concentration, heating at 90°C and then incubation at chilled temperatures on growth from non-proteolytic *Clostridium botulinum*. *Letters in Applied Microbiology* 1995, 21, 50-54.
21. Peck MW. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J Appl Microbiol.* 2006,

101(3), 556-70.

22. Proctor VA & Cunningham FE. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1988, 26, 359-395.
23. Bad Bug Book. Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins. 2nd Edition. <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/bad-bug-book-second-edition>
24. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) con relación a los envases activos e inteligentes. Número de referencia: AESAN-2010-011. https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/ENVASES_ACTIVOS_INTELIGENTES.pdf.

