

ESTRATEGIAS PARA MINIMIZAR LOS RIESGOS ASOCIADOS A *Listeria
monocytogenes* EN EL PROCESAMIENTO DE LECHE PASTEURIZADA

NIDIA LUCELY MESA RAMÍREZ

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA
ESPECIALIZACIÓN EN INGENIERÍA DE PROCESOS DE ALIMENTOS Y
BIOMATERIALES
BOGOTÁ D.C.
2016

ESTRATEGIAS PARA MINIMIZAR LOS RIESGOS ASOCIADOS A *Listeria*
monocytogenes EN EL PROCESAMIENTO DE LECHE PASTEURIZADA

NIDIA LUCELY MESA RAMÍREZ

Monografía para optar al título de Especialista en Procesos de Alimentos y Biomateriales

Director:
Glaehter Yhon Florez Guzman
Mg Microbiología

UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA - UNAD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS, INGENIERÍA Y TECNOLOGÍA
ESPECIALIZACIÓN EN INGENIERÍA DE PROCESOS DE ALIMENTOS Y
BIOMATERIALES
BOGOTÁ D.C.
2016

Nota de Aceptación

Firma del Presidente del jurado

Firma del Jurado

Firma del Jurado

Bogotá D.C., (09-octubre-2016)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Listeria monocytogenes se constituye en un gran contaminante en plantas procesadoras de alimentos. Su sobrevivencia está determinada por la capacidad del microorganismo para formar biofilms, por las condiciones de diseño de la instalación y por las prácticas de limpieza y saneamiento. Si las condiciones son favorables, su desarrollo es un peligro potencial para los productos alimenticios.

En Colombia es muy escasa la información sobre *Listeria monocytogenes* y sobre las estrategias para minimizar los riesgos en plantas procesadoras de alimentos, y aunque los brotes reportados en el país son escasos, se debe considerar el peligro latente que representa este microorganismo en los entornos de producción de alimentos, por lo que es importante para los involucrados en el proceso de manufactura de alimentos, con énfasis en el procesamiento de leche pasteurizada, ya que la mayor incidencia se presenta en productos lácteos, tener un documento de consulta donde se contextualice el microorganismo y se listen estrategias que minimicen el riesgo asociado, de aquí que la monografía a desarrollar esté dirigida a determinar ¿Cuáles estrategias para minimizar los riesgos asociados a *Listeria monocytogenes* en el procesamiento de leche pasteurizada?

JUSTIFICACIÓN

A pesar de presentarse con una baja frecuencia, actualmente la listeriosis es una de las Enfermedades de Transmisión por Alimentos (ETAs), más letales conocidas, (Ver Tabla 1), esta bacteria es una de las causas principales de contaminación a nivel mundial lo que genera gran alarma en toda la cadena productiva, y por supuesto en los consumidores y las autoridades de vigilancia. Lo que más preocupa de este microorganismo es que una vez instalado en las plantas procesadoras de alimentos, su completa eliminación es poco probable.

Listeria monocytogenes es un microorganismo emergente cuya fuente primaria de ingreso a las personas son los alimentos, pero esto no fue reconocido sino hasta en la década de los 80, debido a varios brotes de listeriosis en Norteamérica y Europa. (World Organization for Animal Health (OIE), 2008)

En Colombia la listeriosis no es una enfermedad de notificación obligatoria, por lo que los diagnósticos asociados a esta enfermedad no son comunes, de allí la razón de que existan pocos datos epidemiológicos de la misma, y, por lo tanto, que no se tenga un diagnóstico real de la incidencia de esta enfermedad, es decir, el hecho de que no se reporte, no es un indicio fiable de que no se esté presentando. En general, la listeriosis se considera una enfermedad inusual en Colombia, ya que se presentan casos esporádicos de los cuales se

tiene poca documentación; esto, sumado a su difícil diagnóstico, dificulta la obtención de datos epidemiológicamente representativos.

Categoría Alimento	Alimento	Año	País	Invasiva/ No Invasiva	# de Casos (muertes)
Cárnicos y Avícolas	Paté	1987-1989	UK e Irlanda	Invasiva	355 (94)
	Paté	1990	Australia	Invasiva	11 (6)
	Lengua de Cerdo en gelatina	1992	Francia	Invasiva	279 (85)
	Chicharrones de cerdo (Paté RTE)	1993	Francia	Invasiva	39 (12)
	Salchichas de carne	1998-1999	U.S.A.	Invasiva	108 (14)
	Paté	1999	U.S.A.	Invasiva	11
	Chicharrones de cerdo (Paté RTE)	1999-2000	Francia	Invasiva	10 (3)
	Lengua de Cerdo en gelatina	1999-2000	Francia	Invasiva	32 (10)
	Delicatesen carne de pavo	2000	U.S.A.	Invasiva	30 (7)
	Carne en conserva y jamón RTE	2000	Australia	No Invasiva	31
	Pavo pre-cocido cortado	2001	U.S.A.	No Invasiva	16
	Delicatesen carne de pavo rebanado	2002	U.S.A.	Invasiva	54 (8)
	Delicatesen Carne RTE	2008	Canadá	Invasiva	57 (23)
	Leche pasteurizada	1983	U.S.A.	Invasiva	49 (14)
	Queso Suave	1983-1987	Suiza	Invasiva	122 (31)
	Queso fresco estilo mexicano	1985	U.S.A.	Invasiva	142 (48)
	Queso azul enmohecido/queso duro	1989-1990	Dinamarca	Invasiva	26 (6)
	Leche achocolatada	1994	U.S.A.	Invasiva	45
	Queso suave de leche cruda	1995	Francia	Invasiva	37 (11)
	Queso suave	1997	Francia	Invasiva	14
Mantequilla de leche pasteurizada	1998-1999	Finlandia	Invasiva	25 (6)	
Crema batida	2000	Canadá	Invasiva	7	
Productos Lácteos	Queso fresco estilo mexicano	2000-2001	U.S.A.	Invasiva	13
	Queso fresco de leche cruda	2001	Suecia	No Invasiva	>120
	Lavado tipo queso	2001	Japón	No Invasiva	38
	Pastel de crema congelado	2001	Bélgica	Invasiva	2
	Queso	2002	Canadá	Invasiva	47
	Queso suave/semiduro usando leche cruda	2002	Canadá	Invasiva	17
	Queso hecho de Leche Paster.	2002	Canadá	No Invasiva	86
	Queso fresco estilo mexicano	2003	U.S.A.	Invasiva	13 (2)
	Queso Fresco	2005	Suiza	Invasiva	10 (3)
	Leche pasteurizada con/sin sabor	2007	U.S.A.	Invasiva	5 (3)
	Quesos	2008	Canadá	Invasiva	38 (2)
	Queso Acido cuajado "Quargel"	2009-2010	Austria-Alemania	Invasiva	34 (8)
	Camarón	1989	U.S.A.	No Invasiva	9 (1)
Pescados y Mariscos	Mejillones Ahumados	1991	Australia	No Invasiva	4
	Mejillones Ahumados	1992	Nueva Zelanda	Invasiva	4 (2)
	Trucha Arcoiris (Ahumada en frio)	1994	Suecia	Invasiva	6 (1)
	Imitación de Carne de Cangrejo	1995	Canadá	Invasiva	2
Frutas y Vegetales	Trucha Arcoiris ahumada en frio	s.f.	Finlandia	No Invasiva	5
	Mezcla de ensalada de col	1981	Canadá	Invasiva	41 (17)
	Ensalada de atún y maíz	1997	Italia	No Invasiva	1566
	Ensalada de fruta ccial/ preparada	1998-1999	Australia	Invasiva	6 (5)
Otros	Ensalada de arroz	1993	Italia	Invasiva	23
	Sándwich pre envasados	2003	Reino Unido	No Invasiva	5
	Pollo envuelto	2009	Australia	Sin datos	8

Tabla 1. Brotes de Listeriosis en el mundo. Los brotes de listeriosis en el mundo están comúnmente asociados con productos cárnicos y productos lácteos, aunque también se encuentran asociados a productos del mar, frutas y vegetales. Fuente: (Health Canada, 2011)

Esta investigación se realiza con el fin de contextualizar el microorganismo *Listeria monocytogenes* y plantear una serie de estrategias que permitan minimizar los riesgos asociados a *Listeria monocytogenes* en toda la cadena de procesamiento de leche pasteurizada.

Listeria monocytogenes presenta una alta resistencia debido a su capacidad de formación de films, lo que hace que se constituya en un contaminante común en las plantas procesadoras de alimentos; y al revisar los datos de brotes de listeriosis en el mundo (ver tabla 1) y los aislamientos en Colombia (ver Figura 1), la mayor incidencia se presenta en productos

lácteos, y la producción y consumo de leche en Colombia es muy alto, lo que implica que la población expuesta también lo sea.

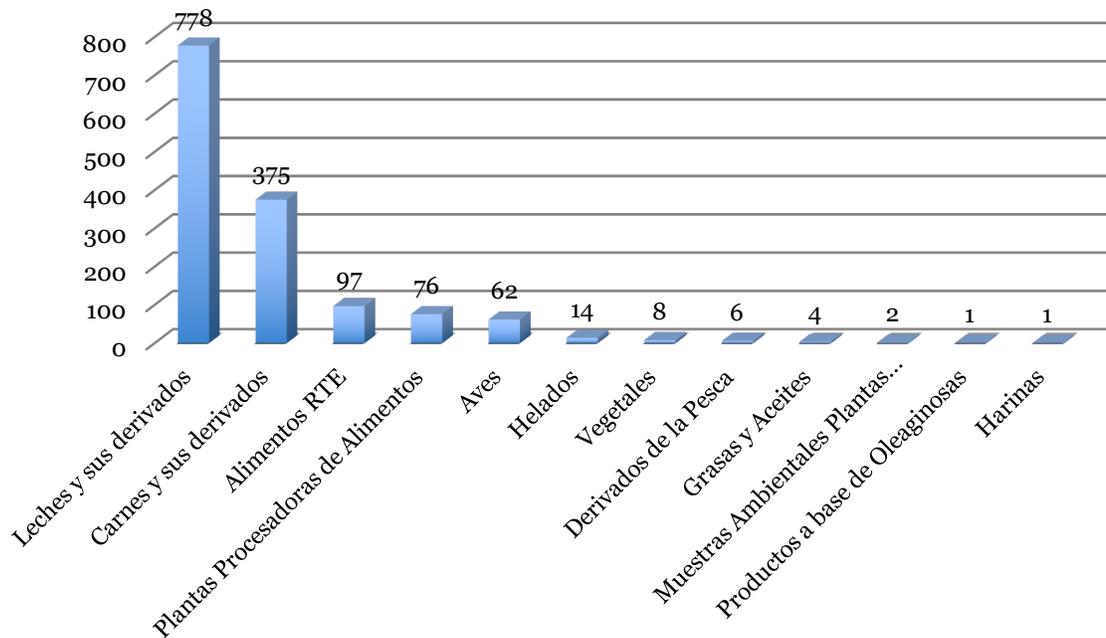


Figura 1. Frecuencia *Listeria monocytogenes* aisladas en Colombia 2000-2009. En Colombia, las categorías de alimentos con mayor frecuencia de aislamientos de *Listeria monocytogenes*, fueron leches y derivados lácteos, carnes y derivados cárnico, pero se observa la mayor incidencia en productos lácteos, duplicando el valor de los productos cárnicos. Fuente: (Muñoz, 2012)

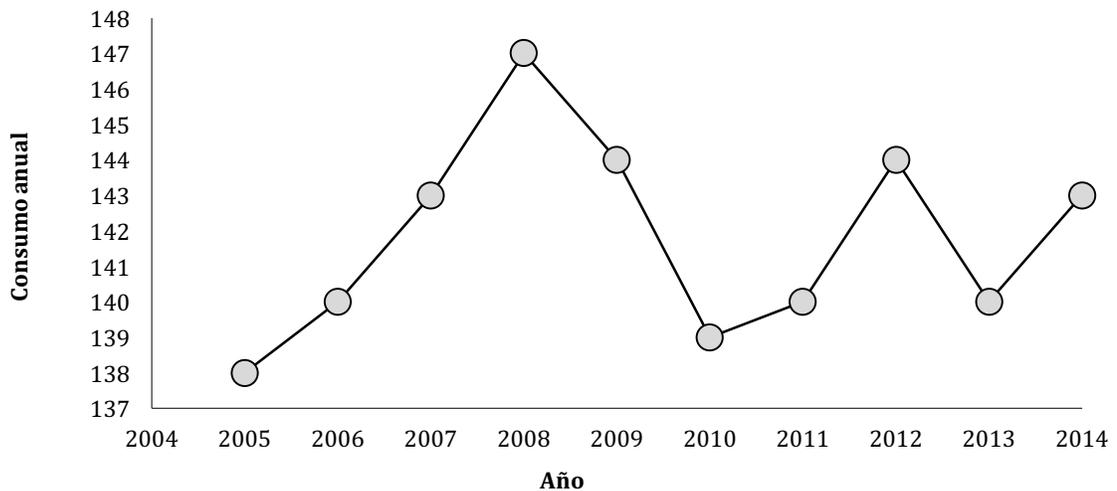


Figura 2. Consumo aparente en litros per cápita anual Leche. En Colombia en el 2014 hubo un leve incremento del 1,5% en la producción y consumo de leche, mostrando una tendencia positiva, dando como resultado un consumo aparente de leche de 143 litros por persona. Fuente: (Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN), 2015)

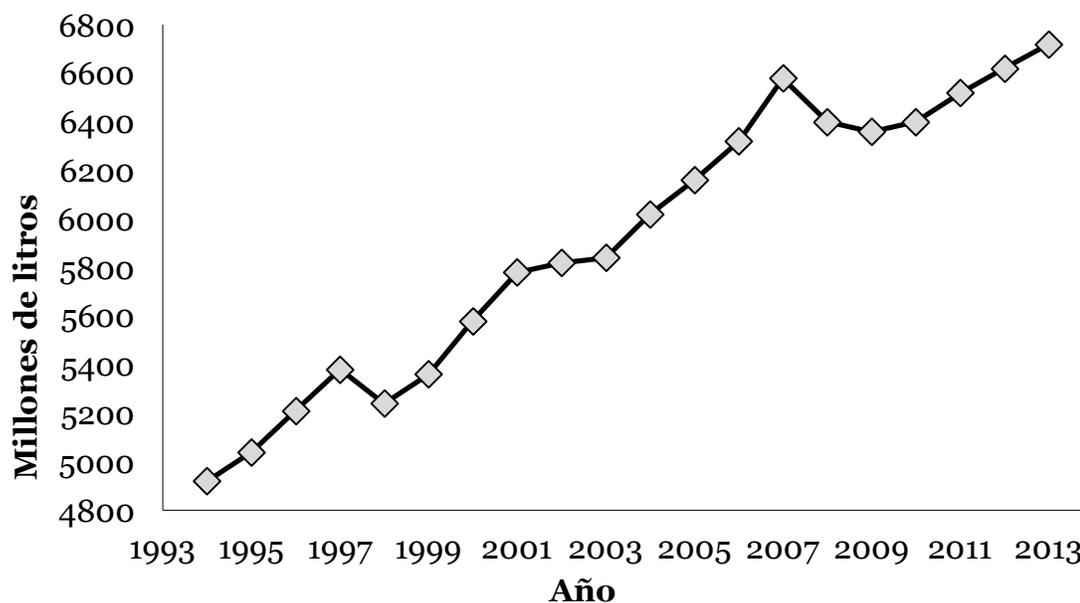


Figura 3. Producción de Leche cruda en Colombia (Millones de litros). La tendencia del consumo de leche en el país muestra un crecimiento progresivo año a año, con muy pocos datos tendientes a la baja. Fuente: (Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN), 2015)

El tipo de investigación a desarrollar es descriptiva y monográfica, basada en la realización de una revisión bibliográfica que busca a través de la recolección de literatura reconocida y actualizada en el campo científico, documentar y organizar la información más significativa relacionada con *Listeria monocytogenes* y generar estrategias que busquen minimizar los riesgos asociados a este patógeno, específicamente para el área de alimentos enfocado en el procesamiento de leche pasteurizada.

TABLA DE CONTENIDO

Pág.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
JUSTIFICACIÓN.....	4
TABLA DE CONTENIDO.....	8
LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	11
INTRODUCCIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	14
OBJETIVO GENERAL.....	14
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
1. <i>Listeria Monocytogenes</i>.....	15
1.1 GENERALIDADES.....	15
1.1.1 Especies.....	15
1.1.2 Medios de trasmisión.....	16
1.2 TAXONOMÍA.....	17
1.3 INFORMACIÓN GENÉTICA.....	18
1.4 RESERVORIOS.....	19
1.5 CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA.....	19
1.5.1 Formación de Biofilms.....	21
1.5.2 Control de los Biofilms en la Industria Alimentaria.....	22
2. <i>Listeria monocytogenes</i> COMO CAUSANTE DE ETA.....	24
2.1 LISTERIOSIS.....	24
2.2 ALIMENTOS ASOCIADOS A <i>Listeria monocytogenes</i>.....	27
2.2.1 Alimentos listos para consumir (RTE).....	27
2.2.2 Productos lácteos.....	27
2.2.3 Productos cárnicos.....	28
2.2.4 Pescados y mariscos.....	28
2.2.5 Alimentos vegetales.....	28
2.3 NORMATIVIDAD.....	29
2.4 SITUACIÓN ACTUAL EN COLOMBIA.....	31
3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO.....	33
3.1 MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y DE IDENTIFICACIÓN CONVENCIONAL.....	33
3.1.1 Métodos de Aislamiento.....	34
3.1.2 Métodos de Identificación Convencional.....	35
3.2 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN RÁPIDA.....	36

3.3	MÉTODOS DE RECONOCIMIENTO DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS	37
3.4	MÉTODOS DE SUBTIPIFICACIÓN	39
3.5	PRUEBAS SEROLÓGICAS	40
4.	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PRODUCTIVO	41
4.1	RECEPCIÓN	42
4.2	ENFRIAMIENTO	42
4.3	ALMACENAMIENTO	43
4.4	HIGIENIZACIÓN	43
4.5	HOMOGENIZACIÓN	43
4.6	DESCREMADO	44
4.7	TRATAMIENTO TÉRMICO (PASTEURIZACIÓN Y REFRIGERACIÓN).....	44
4.8	ENVASADO	45
5.	MINIMIZACIÓN DE RIESGOS ASOCIADOS A <i>Listeria Monocytogenes</i>	46
5.1	DIAGNÓSTICO DE RIESGOS	46
5.1.1	Determinación de puntos de muestreo	48
5.2	EVITAR ENTRADA DEL PATOGENO EN LA PLANTA	48
5.2.1	Homologación de proveedores	48
5.2.2	Control de plagas.....	49
5.2.3	Formación de personal.....	51
5.2.4	Control de operaciones de mantenimiento y reparaciones	51
5.3	EVITAR CONTAMINACIONES CRUZADAS	51
5.3.1	Diseño de instalaciones	51
5.3.2	Circuitos y flujos de producción	52
5.4	ELIMINAR Y/O EVITAR FORMACIÓN DE BIOFILMS	53
5.4.1	Buen diseño higiénico y mantenimiento de las instalaciones.....	53
5.4.2	Sistemas de monitorización en línea.....	53
5.4.3	Limpieza y desinfección	54
5.4.4	Verificar procedimientos de limpieza y desinfección	56
5.5	CONTROLES DE PROCESO	56
5.5.1	Parámetros intrínsecos.....	56
5.5.2	Proceso de producción.....	57
5.5.3	Post-procesado	57
5.5.4	Vida útil prevista y condiciones de conservación y uso.....	57
6.	CONCLUSIONES	58
7.	RECOMENDACIONES	59
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
	ANEXOS.....	68

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Brotes de Listeriosis en el mundo.	5
Tabla 2. Pruebas diferenciales entre especies del genero Listeria.....	16
Tabla 3. Serovariedades asociadas de las diferentes especies de Listeria.....	17
Tabla 4. Límites de crecimiento y sobrevivencia de Listeria monocytogenes.	19
Tabla 5. Mecanismos adaptativos utilizados por Listeria monocytogenes para sobrevivir.....	20
Tabla 6. Alimentos RTE y riesgo relativo de contraer listeriosis por su consumo.	29
Tabla 7. Anexo I, capítulo 1 del Reglamento 2073/2005 en lo relativo a Listeria monocytogenes.	31
Tabla 8. Métodos cromogénicos para recuento o confirmación de colonia.....	34
Tabla 9. Diferenciación de especies de Listeria.....	35
Tabla 10. Métodos de Identificación rápida.....	36
Tabla 11. Métodos de Detección molecular mediante hibridación RNA-DNA.....	38
Tabla 12. Detección de Listeria monocytogenes mediante PCR a tiempo real.	38
Tabla 13. Factores de riesgo en el proceso de leche pasteurizada.....	47
Tabla 14. Resumen de recomendaciones para el muestreo de áreas y equipos.....	48
Tabla 15. Factores que limitan la supervivencia y crecimiento de Listeria monocytogenes..	56

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Frecuencia <i>Listeria monocytogenes</i> aisladas en Colombia 2000-2009	6
Figura 2. Consumo aparente en litros per cápita anual Leche	6
Figura 3. Producción de Leche cruda en Colombia (Millones de litros)	7
Figura 4. Proceso infeccioso y fase intracelular de <i>Listeria monocytogenes</i> Marcador no definido.	¡Error!
Figura 5. Desarrollo de los biofilms	222
Figura 6. Observación de la formación de biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i>	233
Figura 7. Distribución de muertes debidas a agentes zoonóticos en la UE en 2012.....	24
Figura 8. Patogenia asociada a la infección por <i>Listeria monocytogenes</i>	26
Figura 9. Número de brotes de <i>Listeria Monocytogenes</i> 2011-2012 en Colombia	322
Figura 10. Agentes etiológicos identificados en muestras biológicas y alimentos.....	322
Figura 11. Método de referencia ISO 11290-1: Detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	344
Figura 12. Método de referencia ISO 11290-2: Enumeración de <i>Listeria monocytogenes</i>	355
Figura 13. Descripción de la Técnica ELFA	36
Figura 14. Técnica de VIDAS/miniVIDAS <i>Listeria monocytogenes</i>	37
Figura 15. Métodos de Subtipificación.....	399
Figura 16. Esquematización de la cadena láctea.....	411
Figura 17. Medidas Preventivas en el control de plagas.....	500
Figura 18. Mecanismos implicados en la resistencia frente a antimicrobianos en los biofilms	544
Figura 19. Diagrama de Limpieza CIP	¡Error! Marcador no definido. 5

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Representación del ciclo de vida de <i>Listeria monocytogenes</i>	68
Anexo B. Formación y Movilidad de los Biofilms.....	69
Anexo C. Linajes de <i>Listeria Monocytogenes</i>	70
Anexo D. Sistemas Comerciales para la Detección Rápida de <i>Listeria</i>	71
Anexo E. Aplicación de los principios del sistema APPCC.....	73

INTRODUCCIÓN

Uno de los grandes problemas de las plantas procesadoras de alimentos es la presencia en sus instalaciones y equipos de *Listeria monocytogenes*. La introducción de esta bacteria en una planta se da principalmente por materias primas que proceden del campo y su entorno. (Orihuel Iranzo, Bertó Navarro, Canet Gascó, & Cartón, 2014)

Listeria monocytogenes se ha convertido en un microorganismo indeseable en las plantas de alimentos, ya que es posible aislarla de diferentes sitios como sifones, paredes y hasta en instrumentos, equipos y maquinaria a donde llega por diferentes vías de contaminación, incluyendo el contacto con materia prima, o contaminación ambiental. Así mismo, es muy difícil de erradicar ya que tiene la capacidad de producir biopelículas, (Biofilms); es resistente a varios desinfectantes, puede crecer a temperaturas de refrigeración; puede resistir condiciones extremas de pH y de aw, de tal manera que pasa todas las barreras diseñadas contra las bacterias patógenas en alimentos. Es por esto que para controlarla se desarrollan estrategias en la industria, las cuales combinan más de una barrera contra su crecimiento. (Vanegas, 2008)

Listeria monocytogenes tiene característica que la diferencia de todas las bacterias, entre ellas, su resistencia a ambientes desfavorables para el desarrollo, como son los ambientes de alta salinidad o ácidos y su capacidad de sobrevivir o incluso de multiplicarse (aunque muy lentamente) a temperaturas bajas (0 °C), lo que implica su presencia durante meses en equipos de refrigeración. (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria - ELIKA, 2011)

Listeria Monocytogenes es el microorganismo patógeno responsable de la listeriosis, enfermedad transmitida por los alimentos (ETA) de carácter grave. A pesar de presentarse con una baja frecuencia, en la actualidad es una de las ETAs más letales conocidas, causando gran alarma a nivel mundial. (Schöbitz, Ciampi, & Nahuelquin, 2009)

Listeria monocytogenes junto con *Cyclosporidium sp* y *Cyclospora sp* han sido descritos en la época reciente como los patógenos emergentes y son causantes de numerosos brotes. De acuerdo a las investigaciones realizadas, la cantidad de personas que enferman por el consumo de alimentos contaminados, es aproximadamente la tercera parte en los países desarrollados y más o menos dos mil millones de personas en todo el mundo. Las principales causas de morbilidad y mortalidad son las enfermedades diarreicas transmitidas por el agua y los alimentos que enferman hasta 2.2 millones de personas, en su mayoría personas inmunocomprometidas. (Rodas, 2009)

Por todo lo mencionado anteriormente, se hace necesario plantear una serie de estrategias de calidad destinadas a implementarse en las empresas procesadoras de leche pasteurizada, que permitan tener una guía para minimizar los riesgos asociados a este microorganismo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una monografía sobre las estrategias para minimizar los riesgos asociados a *Listeria monocytogenes* en el procesamiento de leche pasteurizada.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer el estado del arte e identificación de intoxicaciones asociadas a la contaminación con *Listeria monocytogenes*.
- Identificar las medidas de control encaminadas a minimizar y/o eliminar el riesgo de contaminación de los alimentos lácteos con *Listeria monocytogenes* enmarcadas dentro del sistema APPCC y las BPMs.

1. *Listeria Monocytogenes*

1.1 GENERALIDADES

Joseph Lister es el responsable del nombre del género *Listeria*. Lister fue el primero en trabajar en el campo de la cirugía en condiciones asépticas como en la prevención de infecciones adquiridas durante intervenciones quirúrgicas. Transcurrieron varios años antes de que el género estuviese constituido por una especie diferente a *Bacterium monocytogenes*, en la actualidad conocida como *Listeria monocytogenes*. El término monocytogenes fue usado debido a que en los conejos infectados se observaba leucocitosis mononuclear. Inicialmente el género *Listeria* fue incluido dentro de la familia *Corynebacteriaceae*, pero, actualmente está clasificada dentro de los bacilos no esporulados Grampositivos, afin con *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Bacillus spp.*, y *Streptococcus spp.*, entre otros. (Ruiz-Bolivar, Poutou-Piñales, & Carrascal-Camacho, 2008)

En el año de 1926 se realiza por primera vez una descripción de *Listeria monocytogenes*, a raíz de una epidemia en unos cerdos de guinea y conejos, pero su reconocimiento como una grave problemática para la salud, solo se dio cuando se presentó un brote invasivo de gran magnitud que provoco una alta tasa de mortalidad en las provincias marítimas de Canadá, quedando demostrando de esta manera que *Listeria monocytogenes* es un patógeno alimentario, responsable de la listeriosis y cuya principal causa es la ingesta de alimentos con presencia de este microorganismo. A partir de este hecho se empezó a investigar sobre su epidemiología y sobre alternativas para garantizar la protección del consumidor. (Baquero, 2008)

Recientes estudios de listeriosis han demostrado que es una enfermedad que ocurre en grupos de alto riesgo como son: mujeres embarazadas, neonatos y adultos inmunocomprometidos, favorecida por condiciones clínicas como edad avanzada, trasplante de órganos, infección con VIH y terapia inmunosupresora, y la afectación más común es la bacteriemia, pero no se puede dejar de lado que en ocasiones causa meningoencefalitis, meningitis o sepsis. (Sánchez V, Mata, Espinoza, & Villarreal, 2006)

La mortalidad atribuible a listeriosis en el mundo tiene un índice del 20% y 30%, pero puede llegar al 80% para las infecciones neonatales. (Medrano, Restrepo, & Vanegas, 2006)

Listeria es un bacilo Gram positivo, no esporulado, no AAR y no encapsulado. Son bastones regulares o pequeños con un diámetro aproximado de 0,4-0,5 μm y con una longitud aproximada de 0,5-2,0 μm , que se presenta algunas veces en cadenas de cocos con arreglos simples y cortos, y con menos frecuencia en largos filamentos. (Liu, 2013)

1.1.1 Especies. El género *Listeria* comprende quince especies: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi (murrayi)*, *Listeria innocua*, *Listeria marthii*, *Listeria*

rocourtiae, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*, *Listeria fleischmanni*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria riparia*, *Listeria grandensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria cornellensis* y *Listeria aquatica*. Las especies más conocidas y más estudiadas son seis: *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi* y *Listeria ivanovii* subespecie *ivanovii* y subespecie *londoniensis*. (Liu, 2013)

Las diferentes especies de *Listeria* se pueden diferenciar entre ellas por su capacidad de fermentar los carbohidratos y por su capacidad β -hemolítica. Las especies *innocua* y *grayi* son consideradas no patógenas, mientras que *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri* rara vez causa infección humana, reservando para *Listeria monocytogenes* la consideración de especie más importante desde el punto de vista humano y en relación con los alimentos. (Sánchez Rodríguez, Serrano Jiménez, Marfil Navarro, & Jodral Villarejo, 2009)

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria ivanovii</i> ^c	<i>Listeria grayi</i>
Iluminación Henry	+	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
β -Hemolisis ^a	+	-	-	+	+	-
Hidrólisis urea	-	-	-	-	-	-
Reducción nitratos	-	-	-	-	-	-
Movilidad SIM	+	+	+	+	+	+
Boges-Prokauer	+	+	+	+	+	+
-Acido	+	+	+	+	+	+
-H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+
-Glucosa	+	+	+	+	+	+
-Esculina	+	+	+	+	+	+
-Maltosa	+/-	+	+	+	+	+
-Ramnosa	+	V ^d	-	-	v	-
-Manitol	-	-	-	-	-	+
-Xilosa	-	-	+	+	+	-
Virulencia ^b	+	-	+	-	-	-

Tabla 2. Pruebas diferenciales entre especies del genero *Listeria*. ^a Prueba de hemolisis en agar sangre de cordero. ^b Prueba del ratón. ^c Las especies que fermentan la ribosa son clasificadas como *Listeria ivanovii* subespecie *ivanovii* y las no fermentadoras como *Listeria ivanovii* subespecie *londoniensis*. ^d V, biotipos variables. Fuente: (Sánchez Rodríguez et al., 2009)

1.1.2 Medios de trasmisión. El agente que causa listeriosis es *Listeria monocytogenes*, que tiene la capacidad de infectar tanto a humanos como a animales. Esta bacteria se distribuye

en toda la naturaleza y es adquirida por los portadores, principalmente por el consumo de agua y alimentos contaminados. (Larraín De La C & Carvajal, 2008)

El consumo de alimentos crudos, entre ellos carnes y verduras, y de alimentos con algún tipo de procesamiento que pueden llegar a contaminarse después de que han sido transformados, destacando en este grupo las carnes frías y los quesos blandos, así como los productos lácteos sin proceso de pasteurización o productos elaborados a partir de leche que no ha sido sometida a pasteurización, constituye la principal causa de brotes epidemiológicos y de enfermedad esporádica atribuibles a contaminación alimentaria. (Ibañez Martí, 2008)

1.2 TAXONOMÍA

Se han descrito 13 serotipos de *Listeria monocytogenes* en base a sus antígenos somáticos y flagelares. Corresponden a 15 antígenos somáticos (I-XV) y 4 flagelares (A-D). Las diferentes combinaciones dan origen a un serotipo, que tiene una combinación antigénica única. Sólo 3 serotipos (1/2a, 1/2b y 4b) son responsables de más del 95% de las infecciones en humanos. Sin embargo, dentro de un mismo serotipo existen diferentes cepas, genéticamente disímiles. (Larraín De La C & Carvajal, 2008)

Listeria monocytogenes de acuerdo a estudios moleculares de su estructura filogenética, tiene tres divisiones genéticas, que a su vez considera tres linajes:

Linaje I: serotipos 4b, 1/2b, 3b, 4d, 4e y 7; en este se consideran todas las cepas que han sido responsables de brotes y casos de listeriosis humanas, tanto casos clínicos como los debidos a transmisión por alimentos con la presencia del patógeno.

Linaje II: serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c; en este se consideran casos de aislamientos tanto en humanos como en animales, así como muestras del ambiente y de alimentos.

Linaje III: incluye tres grupos, III A, IIIB y IIIC, y los serotipos 4a, 4c y 4b; en este se consideran aislamientos de animales; pero son muy pocos los casos asociados a listeriosis humanas. (Muñoz Delgado, Chaves, Rodríguez, & Realpe, 2013)

Especie	Serovariedad
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7
<i>Listeria ivanovii</i>	5
<i>Listeria innocua</i>	4ab, 6a, 6b
<i>Listeria welshimeri</i>	6a, 6b
<i>Listeria seeligeri</i>	1/2b, 4c, 4d, 6b

Tabla 3. Serovariedades asociadas de las diferentes especies de *Listeria*. Existen hasta el momento 13 serovariedades reconocidas de *Listeria monocytogenes*; clasificados en base a los antígenos somáticos (O) y flagelares (H). La Serotipificación de *Listeria monocytogenes* es el primer método de subtipificación y permite identificar rápidamente los aislamientos que necesitan ser analizados posteriormente por electroforesis en campo pulsado (PFGE). Fuente: (Callejo et al., 2008)

1.3 INFORMACIÓN GENÉTICA

La secuencia completa del genoma de *Listeria monocytogenes* NTSN, una serovariedad 4b, que es responsable de más del 50% de los casos de listeriosis, se puede visualizar en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP009897>. (Tan, Wang, Pan, Yin, & Jiao, 2015)

LOCUS X56153 1469 bp DNA linear BCT 06-JUN-2003
DEFINITION *L.monocytogenes* gene for 16S ribosomal RNA.
ACCESSION X56153
VERSION X56153.1 GI:44116
KEYWORDS 16S ribosomal RNA.
SOURCE *Listeria monocytogenes*
ORGANISM [Listeria monocytogenes](#)
Bacteria; Firmicutes; Bacilli; Bacillales; Listeriaceae; Listeria.
REFERENCE 1
AUTHORS Collins,M.D., Wallbanks,S., Lane,D.J., Shah,J., Nietupski,R.,Smida,J., Dorsch,M. and Stackebrandt,E.
TITLE Phylogenetic analysis of the genus *Listeria* based on reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA
JOURNAL Int. J. Syst. Bacteriol. 41 (2), 240-246 (1991)
PUBMED [1713054](#)
REFERENCE 2 (bases 1 to 1469)
AUTHORS Collins,M.D.
TITLE Direct Submission
JOURNAL Submitted (13-SEP-1990) Collins M.D., AFRC Institute of Food Research, Reading Laboratory, Brookers Hill Shinfield, Reading Berks RG2 9AT, U K
FEATURES Location/Qualifiers
source 1..1469
/organism="Listeria monocytogenes"
/mol_type="genomic DNA"
/strain="NCTC10357"
/db_xref="taxon:1639"
rRNA 1..1469
/product="16S ribosomal RNA"
ORIGIN
1 taaagagagt ttgatcctgg ctcaggacga acgctggcgg cgtgcctaat acatcaagt
61 cgaacgaacg gaggaaagagc ttgctctcc aaagttagtg gcggacgggt gagnaacacg
121 tgggaacact gctgtaagt tggggataac tccgggaaac cggggcctaat accgaatgat
181 aaagtgtggc gcatgccacg ctttgaaaag atggtttcgc tatcgcttac agatgggccc
241 gcggtgcatt agctagttgg tagggtaatg gcctaccaag gcaacgatgc atagccgacc
301 tgagagggtg atcggccaca ctgggactga gacacggccc agactcctac gggaggcagc
361 agtagggaat ctccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgctg gtatgaagaa
421 ggttttcgga tcgtaaagta ctggttttag agaagaacaa ggataagagt aactgctngt
481 cccttgacgg tatctaacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcggttaata
541 cgtaggtggc naggctngtc cggatggatt gggcgtnaag cgcgcgcagg cggctcttta
601 agtctnatgt gaaagcccc ggctgaaccg ggnngggta tggaaactg gaagactnga
661 gtgcngaaga ggagagtgga attccacgtg tagcgggtaa atgcgtagat atgtggagga
721 acaccagtgg cgaaggcgac tctctggtct gtnactgacg ctgaggcgcg aaagcgtggg
781 gagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta
841 gggggtttcc gcccttagt gctgcageta acgcattaa gcaactccct ggggagtagc
901 accgcaaggt tgaactcaa aggaattgac gggggccgca caagccggtg agcatgtggt
961 ttaattcгаа gcaacgcgaa gaacctacc aggtcttgac atcctttgac cactctggag
1021 acagagcttt ccctcgggg acaaagtac aggtggtgca tggttgctg cagctcgtgt
1081 cgtgagatgt tgggttaagt cccgcaacga gcgcaacct tgattitagt tgcagcaatt
1141 tagttgggca ctctaaagt actcccgtg caagccggag gaaggtgggg atgacctcaa
1201 atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cagtgctac aatggatagt acaaagggtc
1261 gcgaagcccg gaggtggagc taatcccata aaactattct cagttcggat ttaggctgc
1321 aactgccta catgaagccg gaatcgtag taatcgtgga tcagcatgcc acggtgaata
1381 cgttcccggg cctngtacac accgncgtc acaccagag agtngtaac acccgaagtc
1441 ggtagggtca ccttatgga gccagcccg

Fuente: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/44116?report=genbank>

1.4 RESERVORIOS

Listeria monocytogenes es considerada una bacteria de gran ubicuidad por encontrarse ampliamente distribuida en el medio ambiente. Los principales hábitats de la bacteria se encuentran en lodos, forrajes, suelos, agua y granos ensilados, y la tierra y el estiércol empleado como fertilizante pueden contaminar hortalizas y legumbres. También la podemos encontrar en animales domésticos y silvestres, aves de corral y las personas. Los alimentos de origen animal, como carnes y productos lácteos, pueden contaminarse por contacto con animales y el hombre, que porten la bacteria. *Listeria monocytogenes* ha sido aislada de múltiples alimentos sin tratamiento térmico, como, por ejemplo, verduras y carnes crudas de diferente origen, pero esto no implica que no esté presente en alimentos procesados a los cuales ha ingresado después de su transformación, y ejemplo de ellos son las carnes frías y derivados lácteos como los quesos. Los procesos térmicos como la pasteurización, UHT o el cocinado destruyen la bacteria, siempre y cuando se garanticen las condiciones de tiempo de contacto, temperaturas, flujos y excelentes prácticas después del tratamiento térmico porque se ha evidenciado contaminación después de éste y antes del embalaje en productos como perros calientes y carnes tipo delicatessen. Ésta bacteria tiene una ventaja frente a los demás agentes patógenos transmitidos por alimentos y es que tiende a multiplicarse en alimentos refrigerados contaminados. (Ibañez Martí, 2008)

La resistencia excepcional de *Listeria monocytogenes* se debe a su capacidad de sobrevivir en condiciones adversas como, temperaturas de congelación, concentraciones altas de sal, procesos de secado y, en ciertos casos, altas temperaturas, y esto debido a la facultad de formar biopelículas en todas las superficies, incluidas las de polímero o acero. Se ha descrito que sobrevive en el tracto digestivo de por lo menos 37 especies de mamíferos, entre silvestres y domésticos. También se ha encontrado en algunas especies de mariscos y peces, así como en 17 especies de aves. Respecto a los seres humanos, se ha indicado que puede existir un 10% que podría portar la bacteria de manera asintomática. De acuerdo a los datos descritos, es evidente la presencia de *Listeria monocytogenes* en el medioambiente y muchos animales que son utilizados como alimento de los seres humanos, es muy probable encontrarle en vegetales y carne cruda. (United States Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Service (FSIS), 2014)

1.5 CARACTERÍSTICAS DE CRECIMIENTO Y SUPERVIVENCIA

Parámetro	Mínimo	Máximo	Sobrevivencia
Temperatura	-1,5 a 3 °C	45 °C	-18 °C
pH	4,2	9,4-9,5	3,3-4,2
Actividad del agua (aw)	0,90-0,93	>0,99	<0,89
Sal (% NaCl)	<0,5	12-16	>20

Tabla 4. Límites de crecimiento y supervivencia de *Listeria monocytogenes*. Fuente: (Moreno Ocampo, 2013)

De *Listeria monocytogenes* se conoce que es un microorganismo aerobio, anaerobio facultativo es decir que es capaz de sobrevivir en presencia o en ausencia de oxígeno, que produce infecciones a nivel gástrico, que puede sobrevivir en el interior de las células, incluso en células fagocíticas del sistema monocitomacrófago (células del sistema inmune). (Larraín De La C & Carvajal, 2008)

Característica bacteriana	Mecanismo adaptativo
Termo resistencia	Inducción de proteínas de stress térmico Cambios en la composición lipídica de membrana Acumulación de solutos crioprotectores Cambios transcripcionales (factor sigma B asociado a RNA polimerasa bacteriana)
Tolerancia a pH ácido	Inducción de proteínas de stress ácido Sistema glutamato decarboxilasa Cambios transcripcionales (Factor sigma B) Sistema de transducción histidina kinasa Transporte activo de protones a través de la membrana (tipo H ⁺ -ATPasa)
Osmotolerancia	Inducción de proteínas de stress salino Acumulación de solutos osmoprotectores Cambios transcripcionales (Factor sigma B) Sistema de transducción de señales Kdp
Resistencia a antibióticos y desinfectantes	Formación de biofilms

Tabla 5. Mecanismos adaptativos utilizados por *Listeria monocytogenes* para sobrevivir. *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir en condiciones adversas de salinidad, pH y temperatura, destacando que se desarrolla desde -18 °C a 10 °C, por lo que puede ser transmitida incluso a través de alimentos refrigerados o congelados. Fuente: (Larraín De La C & Carvajal, 2008)

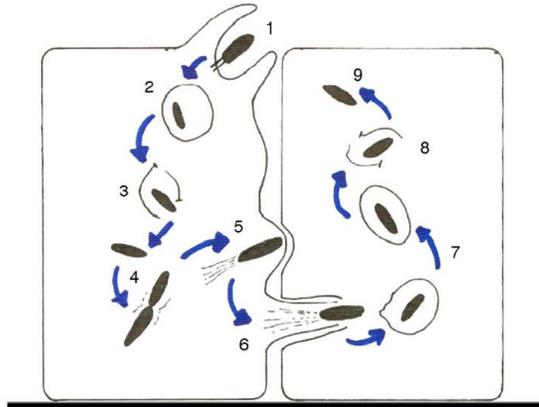


Figura 4. Proceso infeccioso y fase intracelular de *Listeria monocytogenes*. 1) Internalización a la célula del hospedero; 2) Sobrevivencia en fagolisosoma; 3) Escape del fagolisosoma; 4) Liberación y replicación bacteriana en el citosol de la célula blanco; 5) Movilidad bacteriana en base reorganización del citoesqueleto de la célula hospedera; 6) Extensión del filopodio y diseminación directa a la célula vecina; 7) Formación del fagolisosoma; 8) Escape del fagolisosoma; 9) Liberación de *Listeria monocytogenes* al citosol y reinicio del ciclo. Fuente: (Larraín De La C & Carvajal, 2008)

1.5.1 Formación de Biofilms.

En la naturaleza podemos encontrar las bacterias de dos maneras, como bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas, o como bacterias sésiles o formadoras de biopelículas que están unidas entre ellas por un sustrato de sustancias poliméricas extracelulares que han producido. (Villanueva Durand, 2015)

Según la Sección americana de Agricultura (USDA), *Listeria monocytogenes* causa enfermedad en 2,500 personas al año, produciendo 500 muertes. Lo mismo pasa en Europa, la mortalidad es más del doble de la esperada para el resto de los patógenos. (Orellana, 2011)

Las cepas de *Listeria monocytogenes* tiene la facultad de unirse un lapso corto de tiempo a superficies vivas e inertes. La unión a diferentes tipos de superficies lo logra a través del uso de flagelos, pilis y proteínas de membrana, y cuando está en la fase de mayor actividad metabólica es cuando presenta la más alta adhesión. *Listeria monocytogenes* forma biofilms inclusive en superficies de acero, lo que le confiere gran relevancia como factor determinante en la contaminación cruzada. En plantas procesadoras de lácteos, es muy probable encontrar *Listeria monocytogenes* en las diferentes etapas del proceso, así como en la materia prima y en los productos terminados, esto le confiere una probabilidad considerable de aparición de brotes clínicos. (Téllez Peña, 2012)

La formación de biofilms se da en 5 etapas, descritas a continuación:

- a. Acondicionamiento de la superficie. La materia orgánica presente en el agua se adsorbe sobre las superficies y forma la película condicionante, cambiando las propiedades químicas y físicas de la interfase sustrato/fluido y propiciando la adhesión bacteriana. (Villanueva Durand, 2015)
- b. Adhesión reversible. La adhesión reversible inicia cuando se presenta una interacción débil entre la bacteria con el sustrato. Consta de interacciones de Van der Waals, hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas. Durante esta adhesión, la bacteria exhibe movimientos brownianos y es fácilmente removida por fuerzas de rompimiento. (Cadena Moreno, 2011)
- c. Adhesión irreversible. La fase irreversible comienza con la producción de los polímeros extracelulares. (Martínez Rivera, 2014). La transición de la adhesión reversible a irreversible se produce por el cambio de una interacción débil por un enlace permanente mediado por polímeros y apéndices extracelulares. (Villanueva Durand, 2015)
- d. Maduración del biofilm. A medida que el biofilm madura, se desarrolla la estructura típica de las microcolonias con los espacios intercelulares o canales. (Martínez Rivera, 2014). Una vez bien adheridas, los microorganismos empiezan a segregar una matriz conocida como sustancia polimérica extracelular o exopolisacárido (EPS). (Villanueva Durand, 2015)
- e. Desprendimiento de microorganismos. Por último, el ciclo de vida del BF se cierra con el desprendimiento las células albergadas en el BF (individualmente o agrupadas) lo abandonan y vuelven al medio planctónico pudiendo colonizar nuevos nichos. (Hernández Puga, 2016)

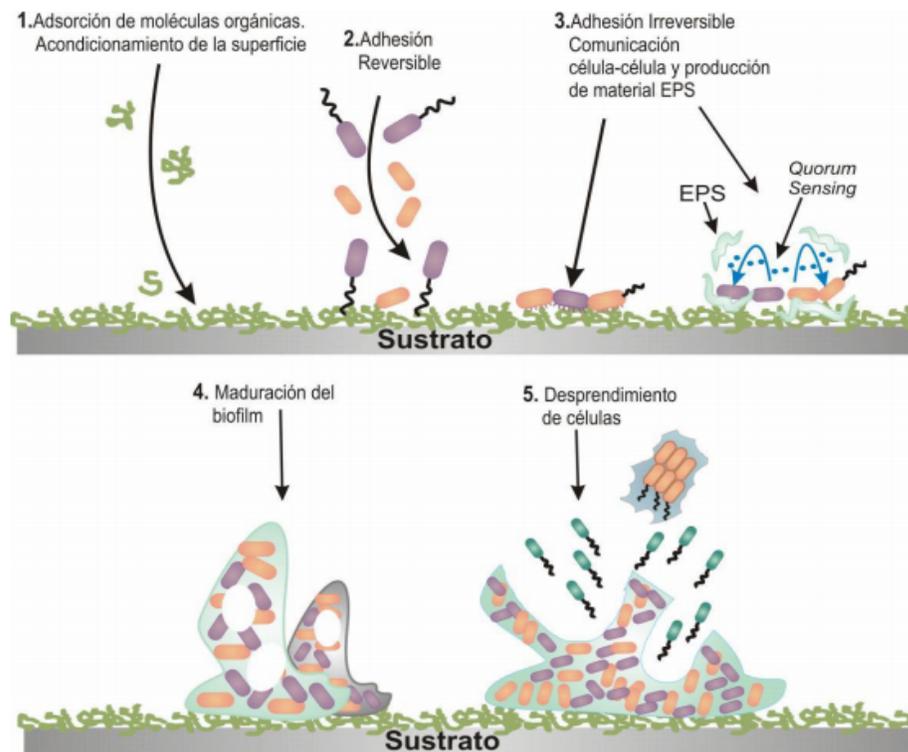


Figura 5. Desarrollo de los biofilms. La formación de biofilm es un proceso dinámico y complejo que conlleva 5 etapas. Fuente: (Martínez Rivera, 2014)

Uno de los rasgos principales que diferencia a los Biofilms de las células en suspensión es la formación de la matriz extracelular que las engloba. Esta matriz está compuesta en su mayor parte por agua (95-97%), así como por polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos que las mismas células producen y excretan (las llamadas EPS), pero también se encuentran presentes flagelos, pili y fimbrias, vesículas, enzimas y DNA extracelular (eDNA) procedentes de la lisis celular o del medio circundante. (Hernández Puga, 2016)

1.5.2 Control de los Biofilms en la Industria Alimentaria.

El principal riesgo de *Listeria monocytogenes* radica en la facilidad que tiene este microorganismo para formar biopelículas en aquellos materiales empleados en las empresas de alimentos, como acero inoxidable y diferentes tipos de polímeros. La formación de biopelículas es un proceso muy rápido, pues de acuerdo a observaciones se ha determinado que en 20 minutos logra adherirse a diferentes tipos de superficies (Acero inoxidable, polipropileno, goma y vidrio) y en un periodo de una hora empieza a generarse material exacelular (EPS), y a las 24 horas ya se observa la formación de un biofilm con dos capas de células. La temperatura óptima es 18 °C, pero varía entre 4 y 45 °C. Esta particularidad de formar tan fácilmente biopelículas es el principal factor que determina la supervivencia, el crecimiento y la persistencia de *Listeria monocytogenes* en plantas procesadoras de alimentos. Las biopelículas protegen a los microorganismos de las temperaturas adversas, tanto altas como bajas, así como de condiciones ambientales no óptimas y de los procedimientos comunes de limpieza y desinfección, lo que confiere una alta dificultad para su eliminación. Por esta razón, *Listeria*

monocytogenes se puede aislar de superficies frecuentemente después de los procedimientos de limpieza y sanitización. Los procedimientos de limpieza y desinfección ineficientes, superficies de los equipos e instalaciones con irregularidades, defectos, poros, defectos o cavidades, restos de suciedad, así como la presencia de humedad y nutrientes, favorecen la formación de biopelículas. (Orihuel Iranzo et al., 2014)

De manera global, la lucha contra los biofilm en la industria alimentaria, se suele clasificar en 3 opciones, necesarias cada una de ellas para poder lograr un resultado positivo. En primer lugar, se debe prevenir la formación del biofilm, inhibiendo la adhesión de los microorganismos a las superficies y equipos. En segundo lugar, se deben aplicar procedimientos de limpieza que impidan el crecimiento de los biofilms y, por último, se deben emplear acciones que eliminen los biofilm maduros que hayan podido desarrollarse. (Hernández Puga, 2016)

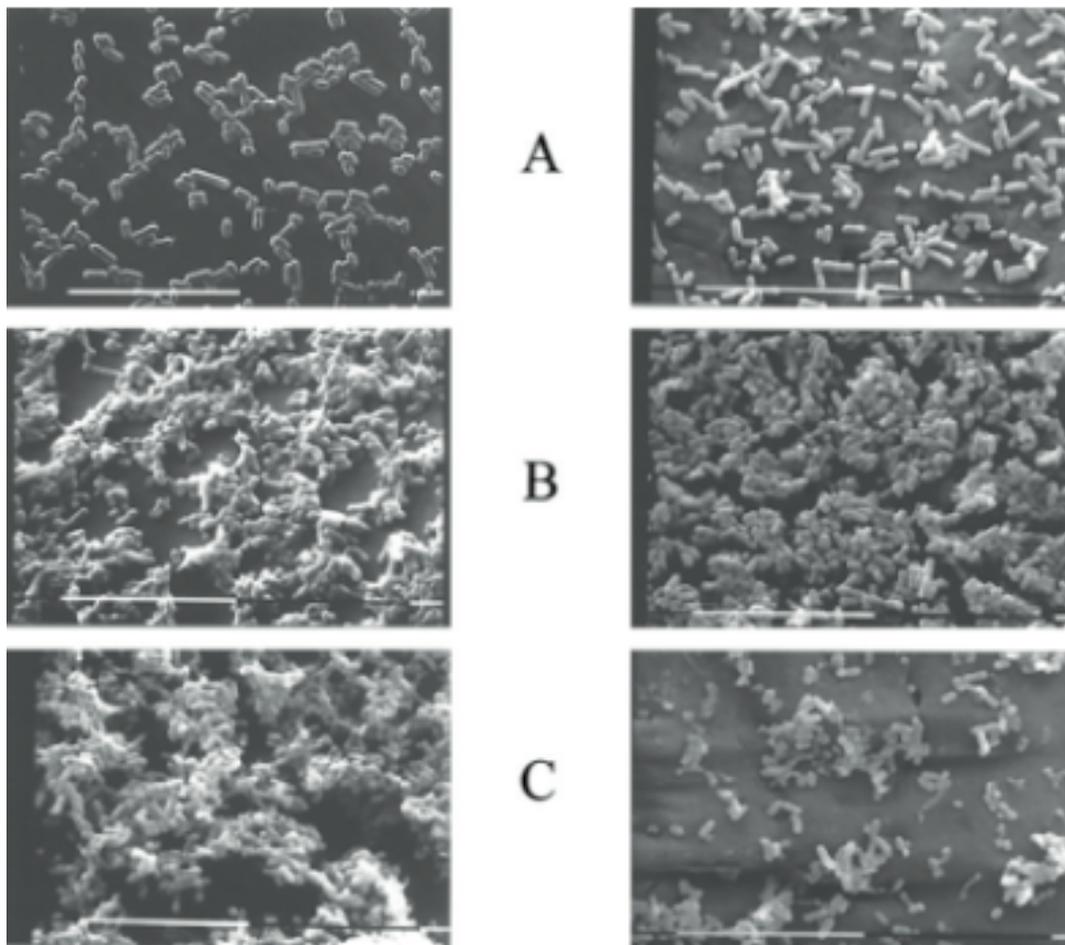


Figura 6. Observación de la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes*. Observación por microscopía electrónica de barrido de la formación de biofilms de la bacteria a 37 °C sobre acero inoxidable (izquierda) y PTFE (derecha) a las 6 h (A), 2 días (B) y 7 días (C). Barra = 10 μ m. Fuente: (Orihuel Iranzo et al., 2014)

2. *Listeria monocytogenes* COMO CAUSANTE DE ETA

2.1 LISTERIOSIS

La listeriosis es una de las enfermedades más importantes de transmisión por alimentos. Las manifestaciones de la enfermedad en el hombre comprenden septicemia, meningitis (o meningoencefalitis) y encefalitis, habitualmente con síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre. (World Organization for Animal Health, 2009)

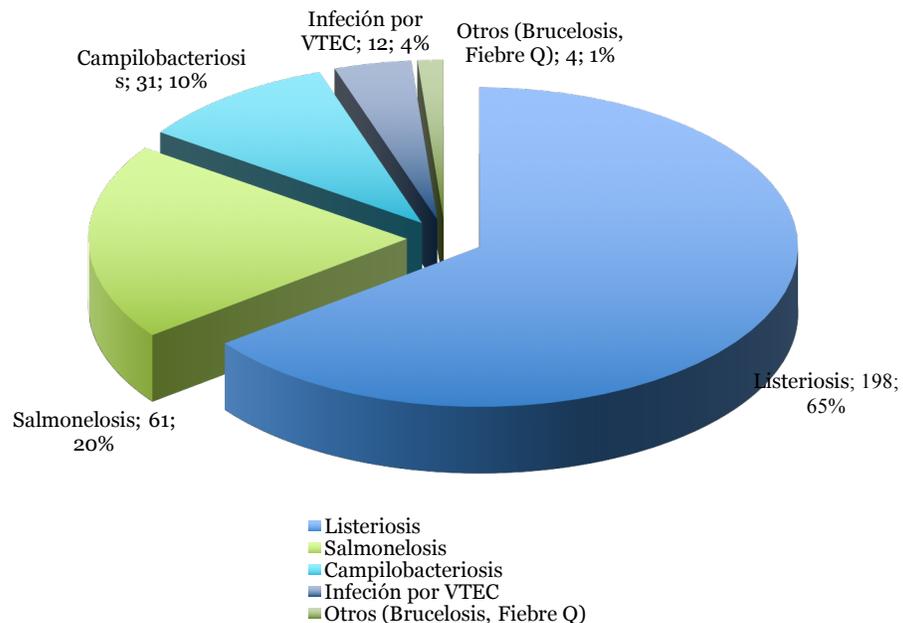


Figura 7. Distribución de muertes debidas a agentes zoonóticos en la UE en 2012. Según el Informe EFSA (2014), la listeriosis es la causante del 65% de las muertes por agentes zoonóticos. Fuente: (Bover-Cid & Garriga, 2014)

El número de casos de listeriosis en humanos reportados en la UE en 2012 se incrementó en un 10,5% en comparación con 2011. La tasa general de notificación de la UE era de 0,41 casos por 100.000 habitantes. Las tasas de notificación más altas de la listeriosis, en 2012, se registraron en niños menores de uno y de las personas de 65 años o más. Un total de 198 muertes por listeriosis fueron reportados en 2012”. (European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2014).

La listeriosis es una enfermedad atípica, de origen alimentario, cuyo interés en salud pública deriva de alta letalidad que comúnmente afecta a inmunodeprimidos, con enfermedades subyacentes que causan un deterioro manifiesto en la inmunidad mediada por linfocitos T. (Domínguez Carmona, 2010). Aunque la morbilidad de la listeriosis es relativamente baja, la mortalidad de la enfermedad sistémica/encefalítica puede ser muy alta, con valores cercanos al 30%. (World Organization for Animal Health, 2009)

De acuerdo al estado inmunológico del huésped, podemos clasificar la listeriosis en (Callejo et al., 2008):

Listeriosis feto materna y listeriosis neonatal

Este tipo de infección ocurre con la invasión del feto por vía placentaria y desarrollo de corioamnionitis. Debido a lo anterior, es posible que ocurra un aborto en los 5 primeros meses de gestación, así como partos prematuros, o si el embarazo se lleva a término, el recién nacido puede presentar infección generalizada.

La infección es por lo general asintomática en las madres, y se puede confundir con una gripe común por el cuadro que se presenta, que incluye fatiga, escalofríos, dolores de cabeza, musculares y articulares. Esta sintomatología se da entre los 2 a 14 días antes del aborto. Otro tipo de listeriosis, aunque no muy frecuente, es la listeriosis neonatal tardía, la cual se presenta entre 1 a 8 semanas después del parto y el cuadro clínico incluye un síndrome febril acompañado por meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía. La forma en que sucede la contaminación del recién nacido es por aspiración de exudados maternos contaminados durante el parto. La mortalidad de la listeriosis neonatal tardía es más baja (10 al 20%), pero al igual que la listeriosis temprana, puede dejar secuelas tales como hidrocefalia y retraso psicomotor.

Listeriosis del adulto

La infección más frecuente en el adulto es la invasión del sistema nervioso central (SNC) (55 al 70% de los casos). Desarrolla generalmente como meningoencefalitis acompañada por cambios severos de la conciencia, desordenes del movimiento y en algunos casos parálisis de los nervios craneales. La mortalidad de la infección del SNC es del 20%, pero puede ser del 40 al 60% si está asociada a una enfermedad de base. En ciertos grupos de riesgo, como enfermos de cáncer, *Listeria monocytogenes* es la causa más frecuente de meningitis bacteriana. Otra forma frecuente de listeriosis es la bacteriemia o septicemia que tiene una alta tasa de mortalidad (hasta el 70%), si está asociada a una enfermedad inmunosupresora. Hay otras formas clínicas atípicas (5 al 10% de casos) tales como endocarditis, miocarditis, arteritis, neumonía, pleuritis, hepatitis, colecistitis, peritonitis, abscesos localizados, artritis. Investigaciones de brotes alimentarios han dado la evidencia de que un síndrome gastrointestinal es la manifestación clínica de la infección por *Listeria monocytogenes*.

La *Listeria monocytogenes* es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas presentes en los seres humanos: intestinal, hemato-encefálica y placentaria. El proceso de infección comprende varias etapas: adhesión e invasión de la célula hospedera, escape de la vacuola, multiplicación intracelular y proliferación extracelular. (Bello, Vera, González, & Domínguez, 2013)

Varios factores de *Listeria monocytogenes* que median los pasos claves de la infección, han sido identificados (Callejo et al., 2008):

(a) Adhesión e invasión: Las células de *Listeria* inicialmente se adhieren a los enterocitos intestinales y penetran la pared intestinal. El proceso es mediado por la internalina (InlA) y InlB (otro miembro de la familia de internalinas, caracterizada por la presencia de unidades repetitivas de leucina) y/o otros factores de internalización. En respuesta, las bacterias quedan dentro del fagosoma en las células del huésped.

La entrada de *Listeria monocytogenes* dentro de la célula humana es mediada por la interacción de la proteína de superficie, internalina, con su receptor humano E-caderina. La interacción internalina-E-caderina es especie específica y se basa en la presencia de un solo aminoácido de diferencia en el residuo 16 en la molécula de E-caderina, el cual es prolina en

humanos y ácido glutámico en ratón. Evidencias epidemiológicas apoyan el rol de la internalina en la listeriosis humana, no solo para atravesar la barrera intestinal, sino también para cruzar la barrera hematoencefálica y la placentaria.

(b) Vacuola primaria de lisis: La listeriolisina O (LLO) y la fosfolipasa C fosfatidil inositol específica (PI-PLC) lisan el fagosoma para permitir el escape de las bacterias de la vacuola fagocítica.

(c) Desarrollo intracelular: La propagación bacteriana dentro del citosol es mediada por un transportador de fosfato hexosa bacteriano (Hpt) y una ligasa protein lipoato (LpLA1) que permiten que *Listeria monocytogenes* capte de la célula huésped fuentes de carbono.

(d) Diseminación de una célula a otra: Una vez que las bacterias se multiplicaron en el citosol de la célula huésped, se desplazan utilizando la nucleación de filamentos de una proteína, actina (ActA). Esto produce un movimiento dirigido de las bacterias hacia la membrana celular de la célula huésped y promueve estructuras semejantes a pseudópodos que se extienden dentro de las células vecinas. Este mecanismo hace que se infecte la célula y la bacteria quede dentro de una vacuola de doble membrana (Cossart et al., 2003). (Tilney and Portnoy, 1989).

(e) Lisis de la vacuola de doble membrana: La fosfolipasa C fosfatidilcolina específica (PC-PLC) de *Listeria* junto con la LLO lisan la vacuola de doble membrana y liberan las bacterias que infectan la célula vecina.

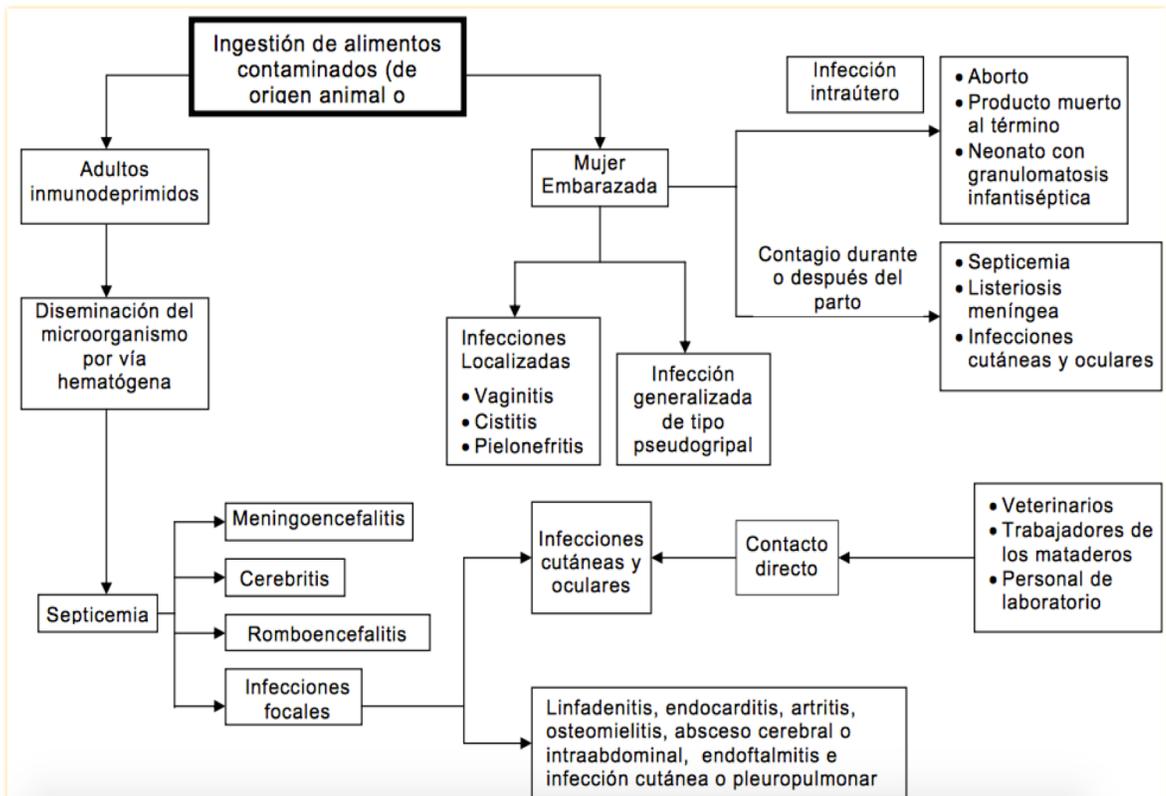


Figura 8. Patogenia asociada a la infección por *Listeria monocytogenes*. Fuente: (Callejo et al., 2008)

2.2 ALIMENTOS ASOCIADOS A *Listeria monocytogenes*

El crecimiento de *Listeria monocytogenes* en alimentos viene influenciado por factores intrínsecos (pH, aw, nutrientes, etc.) propios del alimento y extrínsecos (Temperatura, humedad relativa, etc.) propios de zona de procesamiento y almacenamiento. (García & Bermejo, 2014)

2.2.1 Alimentos listos para consumir (RTE).

Un alimento listo para el consumo según el Reglamento (CE) 2073/2005 (Article 2, g) se define como un 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 (Bover-Cid & Garriga, 2014). Éstos alimentos, (quesos, salami, salchichas Frankfurt, patés, etc.) constituyen un alto riesgo de contaminación listeriósica para ciertas industrias alimentarias y para los productos que fabrican. (Domínguez Carmona, 2010)

2.2.2 Productos lácteos.

La leche, por sus características, como altamente rica en nutrientes y con una elevada actividad acuosa (Aw por sus siglas en inglés), es un caldo de cultivo perfecto para el crecimiento de bacterias (Zumbado Gutiérrez & Romero Zuñiga, 2016). La leche es un alimento de consumo muy frecuente en muchos países occidentales, y que se consume en porciones grandes. Como producto básico crudo procedente de granjas, está frecuentemente contaminado, pero una pasteurización adecuada elimina eficazmente el microorganismo. (Buchanan et al., 2004). La pasteurización de la leche es el mejor método de higienización de la misma, junto con el procesado UHT, el más utilizado en la actualidad. Sin embargo, como la leche pasteurizada constituye un buen sustrato para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y dado que para conservarla debe mantenerse a temperaturas de refrigeración, si ocurriera algún fallo en el proceso podría contaminarse con listerias del ambiente. En los quesos elaborados con leche con listerias viables, la *Listeria monocytogenes* sobrevive al proceso de elaboración por su resistencia al calor (hasta 40-45 °C), al frío (4-6 °C) y por su tolerancia a la sal. (Domínguez Carmona, 2010)

La formación de biopelículas en la industria procesadora de productos lácteos está determinada por las características de las superficies en contacto con la leche, las propiedades de los constituyentes de la leche y la capacidad de los microorganismos para adherirse a las superficies. Las superficies empleadas actualmente en la industria láctea son mayoritariamente de acero inoxidable tipo 314 o 316, con variaciones en su acabado o pulido. El acabado del acero inoxidable determina la rugosidad de la superficie y por consiguiente la capacidad para adherir microorganismos y su higienización, además sumado a posibles grietas o rasguños en los equipos se favorecerá el desarrollo de biopelículas. Los constituyentes de la leche también juegan un rol importante en la higiene de las superficies ya que colaboran con el desarrollo de las biopelículas. (Vanegas Molina, 2015)

2.2.3 Productos cárnicos.

La carne es una matriz rica en nutrientes que proporciona un entorno adecuado para la proliferación de diversos microorganismos, deteriorantes y patógenos. (Heredia, Dávila - aviña, Soto Solís, & García, 2014). La contaminación de la carne y sus productos con *Listeria monocytogenes* se ha puesto de manifiesto en numerosas ocasiones en rumiantes, cerdos y aves. Entre los productos cárnicos más frecuentemente contaminados con *Listeria monocytogenes* destacan los siguientes: carne picada, pasta de salami, salchichas de pavo, mortadelas y otros fiambres. (Domínguez Carmona, 2010). El crecimiento de *Listeria monocytogenes* viene determinado por la presencia de algunos compuestos como el NaCl, el lactato o los nitratos y nitritos presentes en la composición de productos cárnicos. Las condiciones ambientales típicas de una planta de procesado, así como las de las zonas de almacenamiento, pueden favorecer la adaptación y la resistencia del patógeno, lo cual favorecerá su mejor desarrollo en estos medios. (García & Bermejo, 2014). Algunas características inherentes a los productos cárnicos curados (como el contenido en sal y nitritos, y los valores bajos de pH y actividad de agua) contribuyen a la reducción gradual de las poblaciones de bacterias patógenas durante la curación y garantizan habitualmente su seguridad. No obstante, estas características resultan insuficientes para impedir la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en este tipo de productos, en los que se ha descrito que un bajo número de células puede persistir durante varias semanas cuando en su elaboración no se han empleado cultivos iniciadores. (Ortiz Jareño, 2016)

2.2.4 Pescados y mariscos.

Listeria monocytogenes ha sido aislada de muchos productos marinos, incluidos crustáceos, moluscos y peces, tanto frescos, como congelados o procesados culinariamente y después refrigerados o congelados. (Domínguez Carmona, 2010).

2.2.5 Alimentos vegetales.

Según Domínguez la mayoría de las hortalizas frescas (rábanos, pepinos, col, patatas, etc.) se han aislado cantidades generalmente bajas de *Listeria monocytogenes*. A diferencia de las hortalizas de acidez baja (lechuga, escarola, col), que son ingredientes corrientes de ensaladas, los tomates y zanahorias no son un buen sustrato para el crecimiento y multiplicación de *Listeria monocytogenes*. La contaminación de estos alimentos acaece a partir del suelo, el agua, el estiércol animal, la vegetación en descomposición y los efluentes de las aguas residuales de plantas de tratamiento y potabilización del agua. (Domínguez Carmona, 2010). La flora microbiana normal de las frutas y verduras está compuesta principalmente por microorganismos que se encuentran en la tierra. Estos microorganismos pueden mantenerse viables con una cantidad mínima de carbohidratos, proteínas, sales inorgánicas que se disuelven en la superficie por el agua que proviene de la exudación del propio alimento o del ambiente en el cual se encuentre (Barrera Hernández, 2015). En gran medida la flora microbiana de las frutas y hortalizas refleja el ambiente en el cual se desarrollan. El tipo y cantidad de microorganismos depende de una variedad de condiciones ambientales y la ubicación de la parte comestible de la planta (distancia respecto al suelo). Es de esperar mayor carga microbiana en aquellos que se cultivan inmersas en la tierra

(betabel, zanahorias, papas, etc.). Este ambiente incluye factores extrínsecos como son la temperatura, humedad relativa y atmósfera. (Esquivel Hernández, 2015)

Categoría	Alimentos incluidos en la categoría	
1. Riesgo muy alto a Riesgo alto	Cárnicos	Productos cárnicos cocidos manipulados después del tratamiento de pasteurización Salchichas tipo Frankfurt consumidas sin calentar Paté y otros productos cárnicos para untar
	Productos de la Pesca	Pescado ahumado
	Lácteos	Leche cruda sin pasteurizar
	Productos de la Pesca	Crustáceos cocidos
2. Riesgo alto a riesgo moderado	Lácteos	Productos lácteos con contenido graso alto y otros (mantequilla, crema de leche, etc.) Leche pasteurizada Queso fresco no madurado (> 50% humedad)
		Vegetales
	3. Riesgo moderado a riesgo bajo	Cárnicos
Productos de la Pesca		Conservas de pescado marinado, en vinagre, desecado Productos de la pesca crudos
4. Riesgo bajo a riesgo muy bajo	Lácteos	Queso fresco cremoso Queso blando madurado > 50% humedad Queso semiblando 39%-50% humedad
		Helados y productos lácteos congelados
	Lácteos	Leche fermentada (yogurt, crema ácida) Queso procesado (queso fundido, para untar) Queso duro y curado < 39% humedad

Tabla 6. Alimentos RTE y riesgo relativo de contraer listeriosis por su consumo. Categorización obtenida con el análisis de clúster de los resultados de la evaluación cuantitativa del riesgo relativo para la salud pública para *Listeria monocytogenes* en determinados tipos de alimentos listos para el consumo elaborado por la administración americana. Fuente: (Bover-Cid & Garriga, 2014)

2.3 NORMATIVIDAD

El nivel de *Listeria monocytogenes* tolerado en los países es muy variable y va de tolerancia 0 en 25 g en EE.UU. hasta permitir la presencia de 100 UFC/g en las normas de la Unión Europea. (Michanie, 2013)

La Normativa UE vs. requisitos EEUU. El dilema de la tolerancia cero (Vila Brugalla, 2014):

Hay un debate internacional sobre cómo debe regularse *Listeria monocytogenes*. Debido a la ubicuidad de este microorganismo, los organismos reguladores en muchos países afirman que es imposible producir alimentos libres de *Listeria monocytogenes*. El debate se centra en si el límite debe establecerse en 100 ufc/g al final de la vida útil, dado que este nivel no pone en riesgo a la mayoría de consumidores (no es inherentemente peligroso). De todas formas, es importante remarcar que la presencia de *Listeria* en los alimentos puede suponer un fallo en el control de su proceso productivo; en tal caso, necesitaría una investigación sobre su origen y la aplicación de medidas correctoras. El Codex Alimentarius establece que un elaborador de comida lista para el consumo debería tener implantado un programa de muestreo de equipos y superficies ante el riesgo de presencia de *Listeria monocytogenes*. Además, la normativa debería prever cierto grado de abuso de temperatura por parte del consumidor.

Una directiva del 2004 de Canadá y el Reglamento 2073/2005 de la UE establecen niveles de tolerancia para la *Listeria monocytogenes*. Los productos que han causado listeriosis humana se colocan en una categoría especial y son regulados más estrictamente (deben estar libres de *Listeria*) que los alimentos que no han causado nunca listeriosis (recuento <100 ufc/g). Se han elaborado guías para la realización de estudios de vida útil en productos listos para el consumo en relación a *Listeria monocytogenes*.

Por el contrario, el Reino Unido y los Estados Unidos mantienen criterios de tolerancia cero (ausencia en 25 g) de *Listeria monocytogenes*. Ambos países sostienen que la dosis infectiva debe ser conocida antes de que pueda establecerse un nivel aceptable del patógeno. Sin embargo, el criterio de tolerancia cero parece no ofrecer ningún beneficio adicional, ya que la incidencia de listeriosis en EEUU (alrededor de 0,7 por cada 100.000 personas) es similar a la de países europeos que aplican niveles de tolerancia. Pero puede que a medio plazo esta situación cambie ante: a) La petición popular suscrita en diciembre del 2003 por 15 asociaciones comerciales de los EEUU para que la Food and Drug Administration (FDA) adopte el límite de 100 ufc/g para aquellos alimentos que no permiten el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. b) La publicación durante el 2008 por parte de la FDA del borrador de dos documentos guía acerca de *Listeria monocytogenes* (uno para su personal y otro para la industria), que incluyen el límite de 100 ucf/g para las comidas listas para el consumo que no permiten el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Categoría	Plan de toma de muestras		Límites		Fase en la que aplica el criterio
	n	c	m	M	
1.1 Alimentos RTE destinados a los lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales (4)	10	0	Ausencia en 25g		Productos comercializados durante su vida útil
1.2 Alimentos RTE que pueden favorecer el desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> , que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales	5	0	100 ufc/g (5)		Productos comercializados durante su vida útil
	5	0	Ausencia en 25g (7)		Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato de la empresa que lo ha producido

1.3 Alimentos RTE que no pueden favorecer el desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> , que no sean los destinados a lactantes ni a usos médicos especiales (4) (8)	5	0	100 ufc/g (5)	Productos comercializados durante su vida útil
--	---	---	------------------	--

Tabla 7. Anexo I, capítulo 1 del Reglamento 2073/2005 en lo relativo a *Listeria monocytogenes*.

4) En circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto a este criterio para los siguientes productos alimenticios listos para el consumo: los que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *Listeria monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final), frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas, excluidas las semillas germinadas, pan, galletas y productos similares, aguas embotelladas o envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares, azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate, moluscos bivalvos vivos, sal de cocina. (5) Este criterio se aplica si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. El explotador podrá fijar límites intermedios durante el proceso que deberían ser lo suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil. (7) Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando este no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. (8) Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con $\text{pH} \leq 4,4$ o productos con $a_w \leq 0,92$, productos con $\text{pH} \leq 5,0$ y $a_w \leq 0,94$, productos con una vida útil inferior a 5 días y otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente. Fuente: (Vila Bruggalla, 2014)

El Codex Alimentarius, ofrece tres alternativas (Henriquez Jelves, 2011):

1. Hasta 100 ufc/g en alimentos que no favorecen el crecimiento
2. 0 tolerancia en 25 g (0.04 ufc/g) en alimentos que favorezcan el crecimiento
3. Método alternativo: Hasta 100 ufc/g de muestra en alimentos que pueden favorecer el crecimiento, si se demuestra que este límite no se excede hasta completar 1.3 de la vida útil del alimento.

2.4 SITUACIÓN ACTUAL EN COLOMBIA

Los reportes sobre enfermedades transmitidas por alimentos en Colombia permiten evidenciar que, entre los alimentos procesados, los productos cárnicos y los productos lácteos son los de mayor consumo en el país y los que frecuentemente están relacionados como fuente de contaminación con microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*. (Muñoz Delgado et al., 2013)

Los agentes etiológicos detectados en muestras biológicas, de alimentos o restos de alimentos y superficies, procedentes de brotes ETA en notificación colectiva fueron: *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, Hepatitis A, Complejo entamoeba histolytica/dispar, entre otros. (Folleco Villareal, 2014)

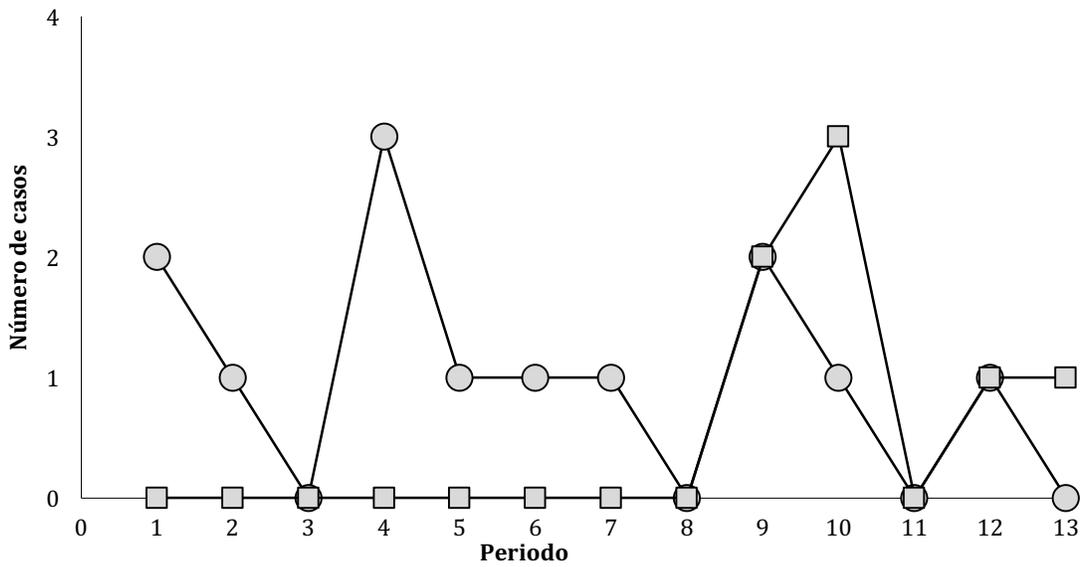


Figura 9. Número de brotes de Listeria Monocytogenes 2011-2012 en Colombia. La gráfica de marcadores cuadrados corresponde al año 2011 y la gráfica de marcadores circulares corresponde al año 2012. Fuente: (Folleco Villareal, 2014)

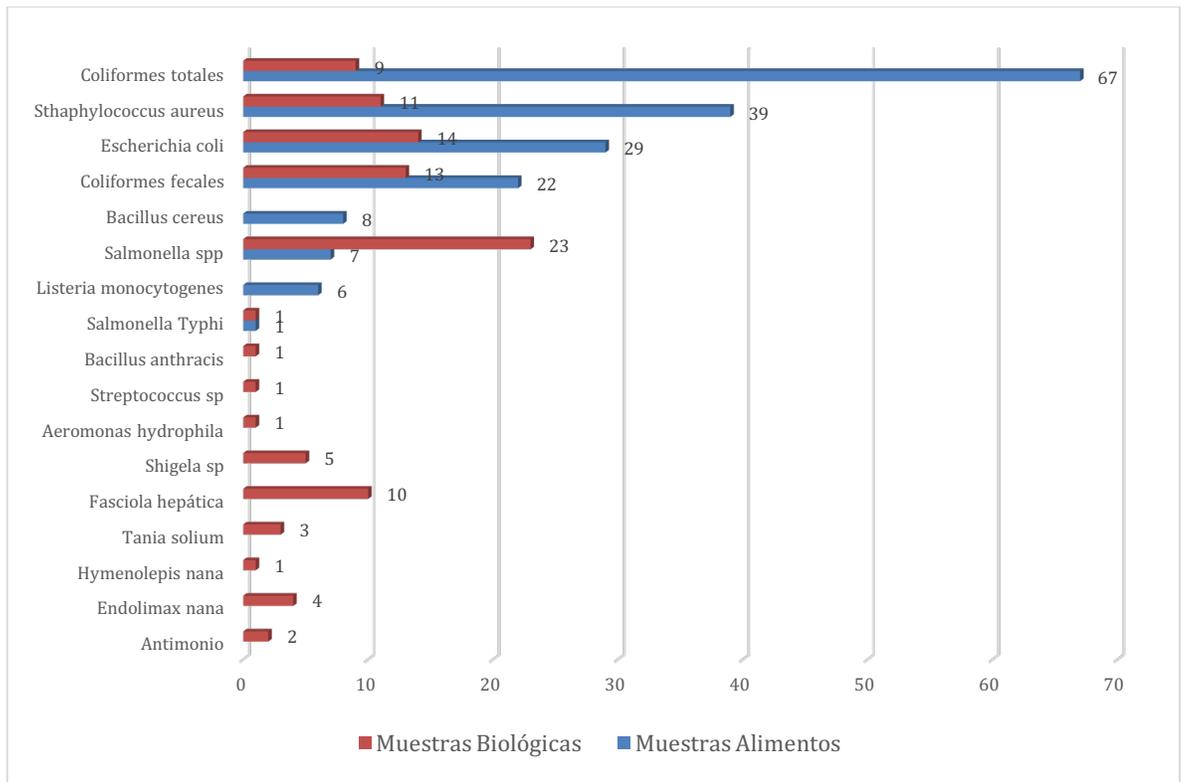


Figura 10. Agentes etiológicos identificados en muestras biológicas y alimentos. Procedencia: Brotes de ETA (notificación colectiva), Colombia, periodo epidemiológico XIII - 2014. Fuente: (Folleco Villareal, 2014)

3. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Actualmente hay diferentes métodos en el mercado, tanto convencionales como rápidos para detectar e identificar *Listeria monocytogenes* en diferentes tipos de muestras de alimentos y provenientes de listeriosis animal. (World Organization for Animal Health, 2009). Sin embargo, las estrictas políticas adoptadas por los gobiernos y agencias alimentarias acerca de los niveles de tolerancia sobre la presencia de *Listeria monocytogenes* en los alimentos, y la implantación del sistema HACCP por parte de las industrias, precisan la aplicación de técnicas de detección rápidas, sensibles y específicas. (Ortiz Jareño, 2016)

Los métodos de nueva generación que se encuentran actualmente en desarrollo, cuyo objetivo final es evitar el pre-enriquecimiento y lograr alternativas al cultivo cuantitativo convencional, incluyen los biosensores y los microarrays de DNA que tienen, potencialmente, la capacidad de detectar directamente (on line) y a tiempo real todos los patógenos relevantes para cada tipo de alimento. (Ortiz Jareño, 2016)

Frente a estos nuevos sistemas de monitorización, los procedimientos usados hasta ahora incluyen tinciones específicas in situ y muestreos, mediante torundas o cupones depositados en la superficie, a intervalos de tiempo establecidos para cada caso, para obtener el recuento de células viables, comúnmente mediante técnicas de siembra tradicionales (Ortiz Jareño, 2016).

3.1 MÉTODOS DE AISLAMIENTO Y DE IDENTIFICACIÓN CONVENCIONAL

A pesar de que en la actualidad existen métodos de identificación rápida, los métodos de identificación convencional tienen gran importancia por las razones que se describen a continuación:

- Obtención del microorganismo en cultivo puro, de gran utilidad reglamentariamente.
- Es el “Gold Standard” para validación y estandarización de los demás métodos.
- Alta sensibilidad del método que no implica equipo de alta tecnología y gran costo

Entre sus desventajas encontramos:

- La finalización de los protocolos implica periodos muy largos de tiempo.
- La experiencia práctica en la técnica requerida para realizar las manipulaciones.
- Se requieren productos químicos, medios y reactivos de distinta naturaleza.
- Las bacterias a determinar pueden ser encubiertas por la presencia de otros microorganismos, y pueden no detectar variantes atípicas.
- La interpretación del crecimiento de microorganismos en placas con los medios selectivos y diferenciales empleados para detectar diferentes especies bacterianas es muy subjetiva.

Para aislar e identificar *Listeria monocytogenes* de diferentes muestras, incluidos los alimentos, el medio ambiente y muestras clínicas de origen animal, se necesitan agentes selectivos y métodos para enriquecer la muestra para mantener en niveles lo suficientemente detectables de *Listeria monocytogenes*. (World Organization for Animal Health, 2009)

	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivannovi</i>	<i>Listeria innocua</i>
Agar Listeria ALOA (AES Chemunex)	Colonia azul + halo	Colonia azul + halo	Colonia azul sin halo
Chrom ID Ottaviani Agosti (Biomerieux)	Colonia azul + halo	Colonia azul + halo	Colonia azul sin halo
Oxoid Cromogénico OCLA	Colonia azul + halo	Colonia azul + halo	Colonia azul sin halo
CHROMagar Listeria	Colonia azul + halo	Colonia azul + halo	Colonia azul sin halo
CHROMagar identificación Listeria	Colonia malva	Colonia blanca	NA
R&F <i>L. monocytogenes</i> (Biosynth)	Colonia azul	Colonia azul	Colonia blanca
R&F cromogénico <i>L. monocytogenes</i> confirmación (Biosynth)	Colonia fluorescente (366 nm)+halo amarillo	Colonia no fluorescente sin halo	NA
RAPID' <i>L. monocytogenes</i> (Bio-Rad)	Colonia azul sin halo	Colonia azul + halo amarillo	Colonia blanca

Tabla 8. Métodos cromogénicos para recuento o confirmación de colonia. Fuente: (Aymerich, 2010)

3.1.1 Métodos de Aislamiento

Existen diversos métodos convencionales para aislar *Listeria monocytogenes* de muestras alimentarias, de los cuales tienen reconocimiento internacional a nivel reglamentario los descritos a continuación:

- Método de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA)
- Método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC)
- Normas ISO 11290
- Método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares franceses. (World Organization for Animal Health, 2009)

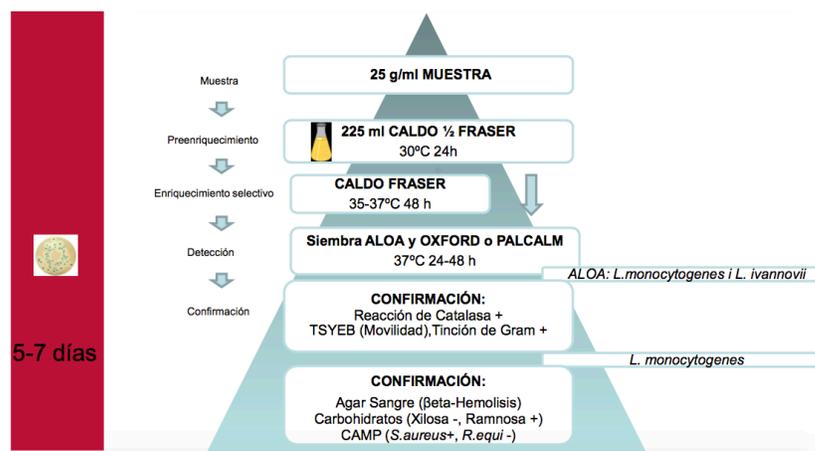


Figura 11. Método de referencia ISO 11290-1: Detección de *Listeria monocytogenes*. El Comité Técnico de la Organización Internacional para la Estandarización ISO/TC 34,

Subcomité SC 9, Microbiología, de Productos Agroalimentarios, recomiendan que se lleve a cabo el máximo esfuerzo para aplicar este método en la medida de lo posible. Fuente: (Aymerich, 2010)

Para la enumeración de *Listeria monocytogenes* se aplica la Norma ISO 11290, parte 2, así como los protocolos opcionales mencionados en los métodos de la FDA y del USDA-FSIS. (World Organization for Animal Health, 2009)

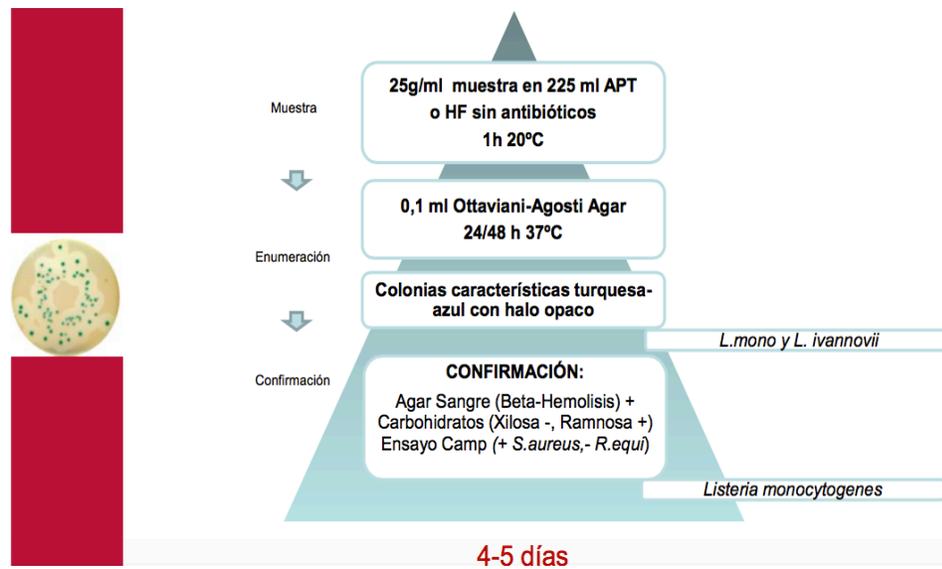


Figura 12. Método de referencia ISO 11290-2: Enumeración de *Listeria monocytogenes*. Fuente: (Aymerich, 2010)

3.1.2 Métodos de Identificación Convencional

Las colonias típicas de *Listeria* spp., una vez crecidas en el medio selectivo diferencial, se seleccionan para la identificación adicional de *Listeria monocytogenes*. La prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) es una herramienta muy útil que facilita la identificación de las especies de *Listeria* spp a partir de los aislamientos. Se emplea en los protocolos ISO y de la AOAC y se considera opcional en los métodos de la FDA y del USDA-FSIS. (World Organization for Animal Health, 2009)

Especie	Hemólisis	Producción de ácido		Prueba CAMP	
		Ramnosa	Xilosa	S. aureus	R. equi
<i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>Listeria innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>Listeria seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>Listeria welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>Listeria grayi</i> subsp. <i>Grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>Listeria grayi</i> subsp. <i>Murrayi</i>	-	V	-	-	-

Tabla 9. Diferenciación de especies de *Listeria*. V: variable; (+): reacción débil; +: >90% reacciones positivas; -: sin reacción. Fuente: (World Organization for Animal Health, 2009)

3.2 MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN RÁPIDA

Diversas técnicas inmunológicas y moleculares permiten la detección de *Listeria monocytogenes* de forma mucho más rápida que los métodos microbiológicos, y pueden emplearse también para la confirmación de los aislados (Ortiz Jareño, 2016). Dentro de estos métodos para facilitar la identificación de *Listeria monocytogenes* encontramos pruebas convencionales y no convencionales, como por ejemplo Vitek, API, MICRO-ID, kits de enzimoimmunoensayo (ELISA).

Tipo de Test	Descripción
Tests miniaturizados Manuales	API, Microgen Listeria ID 
Automáticos	Vitek, Biolog, miniAPI 
Inmunoensayo Manuales	Oxid Rapid test, Transia, Reveal, Tecra, kit Locate, Bioline. 
Automáticos	VIDAS®, Transia. 

Tabla 10. Métodos de Identificación rápida. Fuente: (Aymerich, 2010)

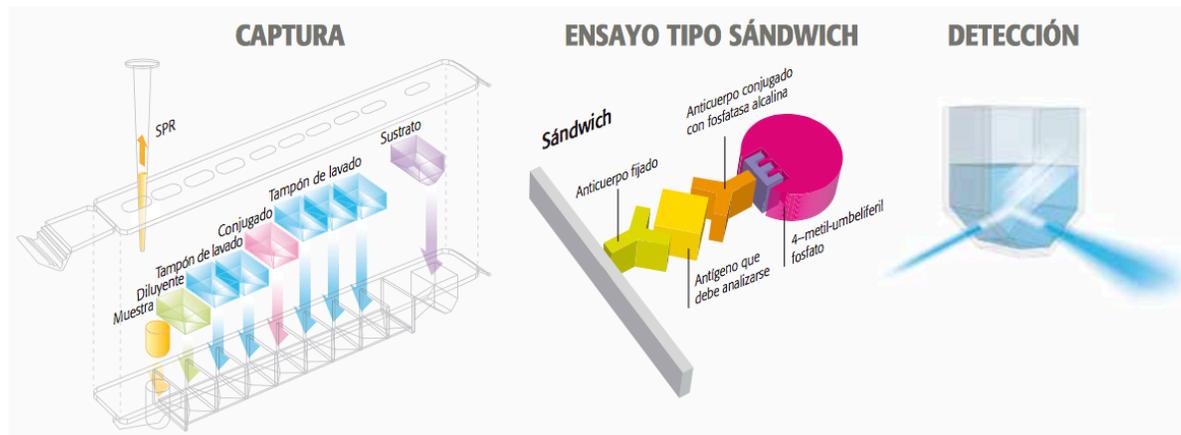


Figura 13. Descripción de la Técnica ELFA. Sistema automático de inmunodetección rápida de patógenos basado en la técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) (Ensayo de fluorescencia ligado a enzima, una técnica ELISA ligada a fluorescencia) y en

técnicas de inmunocentración. La metodología ELFA es una técnica ELISA en "sándwich" de alta sensibilidad y especificidad para la detección de antígenos, con lectura final de fluorescencia, proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra. Los anticuerpos están fijados en el interior de la fase sólida de la reacción, que consiste en un cono, el cual actúa también como pipeta. Fuente: (Biomérieux Industry, 2013)

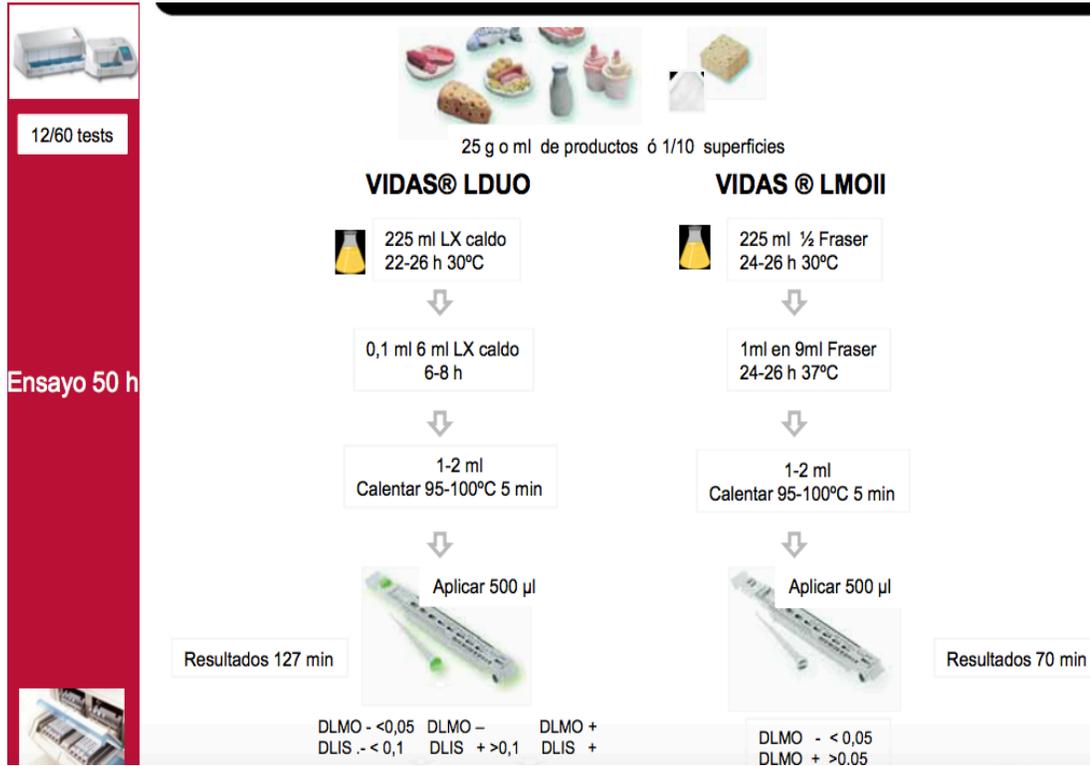


Figura 14. Técnica de VIDAS/miniVIDAS *Listeria monocytogenes*. Esta metodología es de gran utilidad ya que reduce los tiempos del ensayo a sólo 50 horas. Fuente: (Aymerich, 2010)

3.3 MÉTODOS DE RECONOCIMIENTO DE LOS ÁCIDOS NUCLEICOS

Se han desarrollado varios métodos basados en el reconocimiento de los ácidos nucleicos para identificar *Listeria monocytogenes* en alimentos. Las secuencias diana nuevas, a efectos de diagnóstico, incluyen el gen de la metaloproteasa, el gen *prfA* y el gen *ssrA* en un formato de PCR en tiempo real. (World Organization for Animal Health, 2009)

Los diferentes sistemas disponibles en el mercado y validados por AOAC y/o AFNOR se basan en un sistema de hibridación de ácidos nucleicos de doble especificidad mediante una sonda de captura para rRNA y una sonda detectora y con reactivos listos para el empleo. (Aymerich, 2010)

Ensayo	Detección	Certificación	Aplicación	Tiempo ensayo	Nº muestras
GeneQuence (Neogen Corp.)	Colorimétrica (450nm)	AOAC	Después enriquecimiento (48h)	1h50 min	93 muestras. Robotizado 450m/8h y 2-4 patógenos simultáneos
LumiProbe (EuroProbe)	Luminométrica	AFNOR	Después enriquecimiento específico (20h)	2h	Individual o placa 96. 1-200 tests/día
AccuProbe (GeneProbe Inc, Biomerieux)	Luminométrica	AFNOR	A partir de colonias en agar Palcam y después enriquecimiento ½ HF 24-48 h	30 min	Individual o microplaca

Tabla 11. Métodos de Detección molecular mediante hibridación RNA-DNA. Fuente: (Aymerich, 2010)

Ensayo	Casa comercial	Entidad certificadora	Matriz	Año
BAX®System with automated detection PCR assay for screening <i>Listeria monocytogenes</i>	DuPont Qualicon, Inc.	AOAC	Variedad de alimentos	2002
BAX®System Real Time PCR assay for <i>Listeria monocytogenes</i> 24E	DuPont Qualicon, Inc.	AOAC AFNOR	Espinacas, queso procesado, frankfurts, gambas cocidas, superficies acero inox	2009
Roche/Biotecon Diagnostics LightCycler <i>Listeria monocytogenes</i> Detection Kit in combination with ShortPrep foodproof II kit	Roche Diagnostics GmbH BIOTECON Diagnostics GmbH	AOAC	Variedad de alimentos	2004
ADIAFOOD Rapid Pathogen Detection System for <i>Listeria monocytogenes</i>	AES Chemunex	AOAC	Variedad de alimentos	2004
GeneDisc cycler <i>Listeria monocytogenes</i>	Gene Systems ®	AFNOR	Variedad de alimentos	2004
Assurance GDS™ for <i>Listeria monocytogenes</i>	Biocontrol Systems, Inc.	AOAC		2007
IQ-Check <i>Listeria monocytogenes</i> II	Bio-Rad Laboratories	AOAC AFNOR	Salmón ahumado, queso, frankfurt, pavo/	2008

Tabla 12. Detección de *Listeria monocytogenes* mediante PCR a tiempo real. La PCR en tiempo real detecta la fluorescencia emitida en cada ciclo de amplificación de manera que el equipo monitoriza la amplificación y detecta simultáneamente. La reacción y la detección se realiza en tubo cerrado con reactivos listos al empleo, evitando contaminaciones cruzadas y agilizando la obtención de resultados. Fuente: (Aymerich, 2010)

Se ha desarrollado la aplicación de la PCR en tiempo real como un método de detección cuantitativo y específico para *Listeria monocytogenes*. (World Organization for Animal Health, 2009).

3.4 MÉTODOS DE SUBTIPIFICACIÓN

La mayor parte de detecciones reguladoras de *Listeria monocytogenes* no exigen ninguna tipificación específica de las cepas aisladas. Sin embargo, los esquemas de tipificación pueden ser de utilidad en los estudios de brotes, en el seguimiento medioambiental y en la vigilancia de la salud pública.

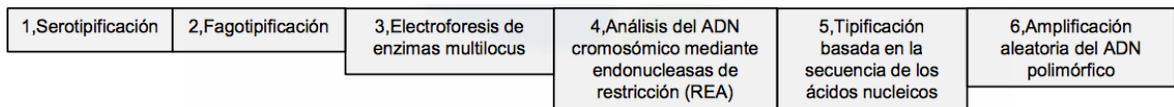


Figura 15. Métodos de Subtipificación. Fuente: (Gallego, 2013)

Serotipificación

Dado que la serotipificación no es rentable, exige habilidad técnica y hace necesarios los antisueros, actualmente a menudo se sustituye por PCR que es una técnica rápida y reproducible. (World Organization for Animal Health, 2014)

Fagotipificación

La tipificación por bacteriófagos es una técnica con un buen poder de discriminación y que puede utilizarse para tipificar un gran número de aislamientos. Sin embargo, las colecciones de fagos disponibles en la actualidad no pueden tipificar una proporción alta de cepas (20–51% en el caso de la colección internacional de tipificación de fagos). (World Organization for Animal Health, 2009)

Electroforesis de enzimas multilocus

Esta técnica se basa en las diferencias en la secuencia de nucleótidos que provocan distintas movilidades electroforéticas de ciertos enzimas metabólicos seleccionados en geles de almidón y puede emplearse en la tipificación de cepas bacterianas relacionadas. Sin embargo, la MEE solo es moderadamente discriminatoria cuando se utiliza en investigaciones epidemiológicas que involucran a *Listeria monocytogenes*. Algunas cepas pueden carecer de ciertas actividades enzimáticas y, por tanto, la técnica puede resultar complicada. Debido precisamente a su naturaleza, los resultados procedentes de diferentes laboratorios son muy variables. (World Organization for Animal Health, 2009)

Análisis del ADN cromosómico mediante endonucleasas de restricción (REA)

Éste es un método útil de subtipificación de *Listeria monocytogenes*. Como estas enzimas son muy específicas en el reconocimiento de las secuencias de nucleótidos, los fragmentos resultantes de la digestión del ADN, de tamaños y movilidad electroforética diferentes,

reflejan las diferencias genómicas, lo que resulta en unas huellas genéticas específicas para cada una de las distintas cepas, que en realidad están relacionadas. El método presenta un grado alto de reproducibilidad debido a la especificidad de las endonucleasas de restricción. (World Organization for Animal Health, 2014)

Tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos

Aunque se han publicado trabajos acerca del análisis de la secuencia de genes únicos como medio para tipificar las cepas de *Listeria monocytogenes*, la determinación de la variación alélica de genes múltiples, introducida recientemente, resulta una metodología de tipificación muy prometedora para este microorganismo. Este enfoque se ha descrito para un pequeño grupo de otros microorganismos y se conoce como tipificación basada en la secuencia multi locus (MLST). (World Organization for Animal Health, 2014)

Amplificación aleatoria del ADN polimórfico

Cuando en la PCR se emplean cebadores seleccionados de forma arbitraria bajo condiciones de baja estringencia, con ADN cromosómico de *Listeria monocytogenes* como molde, los perfiles de los productos de la amplificación generados son útiles para la tipificación de las cepas. La RAPD es una alternativa viable a la fagotipificación y presenta un grado elevado de discriminación. Sin embargo, a pesar de su simplicidad relativa y su capacidad discriminatoria, su desventaja principal es la reproducibilidad irregular de los perfiles. (World Organization for Animal Health, 2009)

3.5 PRUEBAS SEROLÓGICAS

Estas técnicas son poco utilizadas, por su bajo nivel de confianza ya que son carentes de sensibilidad y especificidad. Se han intentado sin éxito los formatos de fijación del complemento, Microaglutinación y ausencia de inmunopresión. (Gallego, 2013)

Tradicionalmente, para diagnosticar la listeriosis no se han utilizado pruebas serológicas de detección de anticuerpos. Han sido muy poco fiables, y carentes de sensibilidad y de especificidad. Se han intentado sin éxito varios formatos, como el ELISA, la transferencia puntual o la Microaglutinación (reacción de Gruber-Widal), para el diagnóstico de casos de listeriosis humana demostrada en cultivo, incluso en ausencia de inmunosupresión. Se ha observado una considerable reacción cruzada con determinantes antigénicos de otros organismos gram positivos. (World Organization for Animal Health, 2009)

4. DESCRIPCIÓN DEL PROCESO PRODUCTIVO

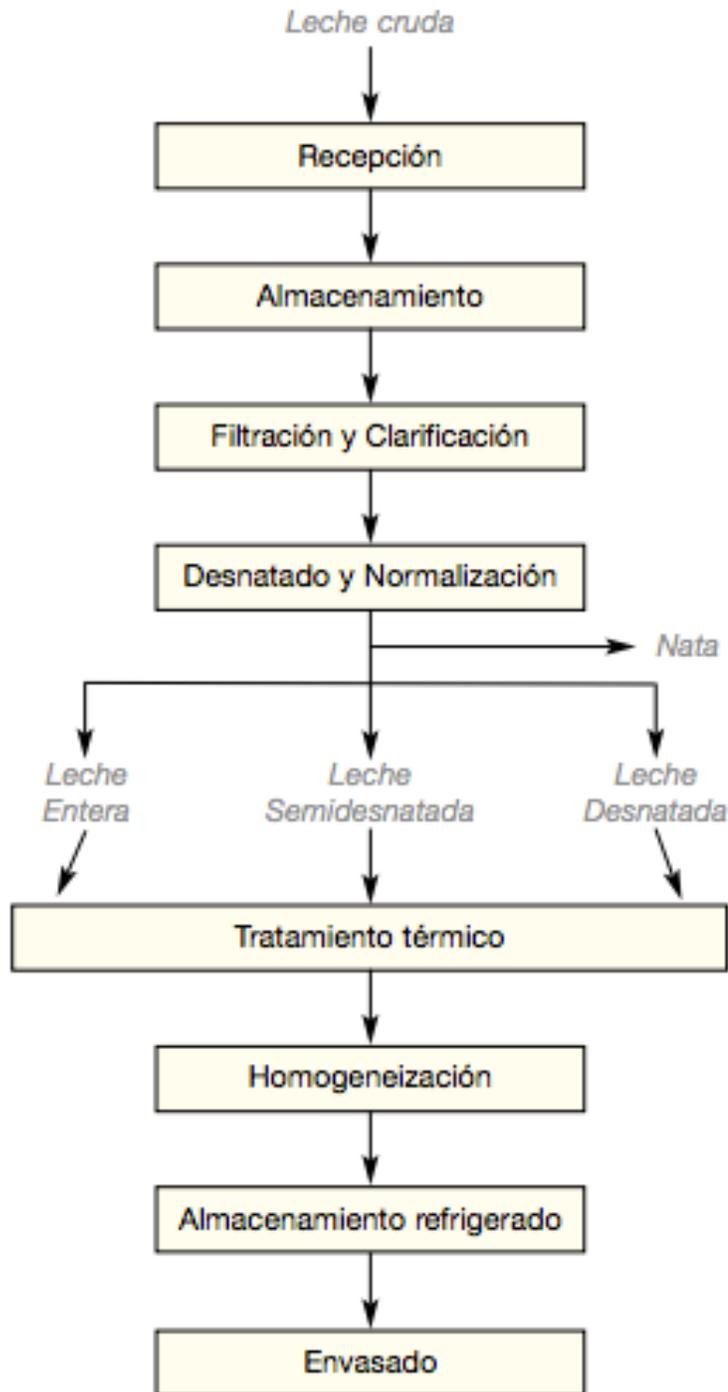


Figura 16. Esquematización de la cadena láctea. Las principales etapas del procesamiento de leche pasteurizada son la recepción, el almacenamiento, el tratamiento térmico y el envasado. Adaptado de: (Instituto Nacional de Salud (INS), 2011).

La leche pasteurizada es la leche, que ha sido sometida a un proceso térmico que garantice la destrucción total de los microorganismos patógenos y la casi totalidad de los microorganismos banales (saprofitos) sin alterar sensiblemente las características fisicoquímicas, nutricionales y organolépticas de la misma. (Herrera Dután, 2016)

4.1 RECEPCIÓN

El proceso se inicia con la recepción de la leche cruda proveniente de los establos. En esta etapa se debe considerar que la entrada de agentes patógenos transmitidos por los alimentos (Por ejemplo *Listeria monocytogenes*), a través de leche cruda contaminada en plantas de procesamiento de alimentos lácteos pueden llevar a la persistencia de éstos en las biopelículas, con la posterior contaminación de productos lácteos procesados y la consecuente exposición de los consumidores a bacterias patógenas; la pasteurización inadecuada, o defectuosa, no va a destruir todos los patógenos presentes en la leche. Asimismo, agentes patógenos, como *Listeria monocytogenes*, pueden sobrevivir y prosperar en los procesos post-pasteurización, lo que conduce a una nueva contaminación de los productos lácteos. Estas vías suponen un riesgo para los consumidores mediante la exposición directa a los patógenos presentes en los productos lácteos re-contaminados, posterior a la pasteurización (Zumbado Gutiérrez & Romero Zuñiga, 2016)

La leche ingresa a la planta a una temperatura superior a los 4°C, sujeta a las condiciones en que es transportada, puede alcanzar hasta los 8 °C. Previo al descargue de la leche, el procedimiento a seguir es el lavado externo de los tanques con agua a presión, donde se emplean mangueras dotadas con implementos mecanizados que permiten el cierre automático, limpiando la suciedad que se adhiere al vehículo durante el transporte, como partículas de polvo. Posterior al lavado la leche se lleva a la siguiente etapa que es el enfriamiento empleando la gravedad a través de mangueras que cumplen con los estándares sanitarios. (Galván Díaz, 2005)

4.2 ENFRIAMIENTO

El rango de temperatura de almacenamiento para la leche que no va a ser utilizada inmediatamente esta entre los 4 °C y 5 °C, y se debe mantener esta condición hasta su procesamiento. Para el proceso de enfriamiento se emplea un equipo conocido como Intercambiador de calor de placas, el cual está compuesto de placas fabricadas en acero inoxidable, dispuestas de forma paralela entre ellas y con separación por empaques de goma, la alternación en su disposición es lo que da lugar a la circulación de las corrientes de flujo de la leche y el agua helada (2 °C y 2.5°C). Esta agua es la que absorbe el calor de la leche y

la enfría hasta alcanzar las temperaturas óptimas para su almacenamiento (4 °C a 5°C). (Mosquera Laverde, 2008)

4.3 ALMACENAMIENTO

Después de su enfriamiento, la leche es transportada a los tanques de almacenamiento, y desde allí se distribuye a las diferentes etapas del proceso. Un tanque de almacenamiento de leche, debe estar diseñado cumpliendo mínimo las siguientes especificaciones:

- El material con el que se construye ha de ser en acero inoxidable
- Contar con sistemas de cerrado hermético
- Pueden ser verticales u horizontales
- Contar con un agitador que cumpla con los requerimientos sanitarios
- Deben incluir un centro de control con indicadores de volumen y temperatura.
- Deben contar dentro de su diseño con los requerimientos mínimos para almacenar leche a las temperaturas establecidas por un periodo de mínimo 20 horas, y en condiciones ambientales adversas deben contar con un material aislante.
- Deben estar ubicados ya sea en la zona de recepción o en zonas de proceso, cerca de los clarificadores e intercambiadores de calor. (Mosquera Laverde, 2008)

4.4 HIGIENIZACIÓN

En la leche cruda por lo general solemos encontrar partículas tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico, así como cuerpos extraños, derivados de las diferentes actividades ejecutadas antes y después del proceso de ordeñado, y dependientes de las condiciones de sanidad en que fueron ejecutadas, por lo anterior se requieren operaciones adicionales que minimicen los riesgos que puedan generar dichas partículas y cuerpos extraños, y estas operaciones son las de filtración y centrifugación, que tienen como objetivo la eliminación de impurezas en la leche anterior a las subsiguientes etapas requeridas para la industrialización de la leche. La etapa de centrifugación es llevada a cabo en clarificadores. (Mosquera Laverde, 2008)

4.5 HOMOGENIZACIÓN

En la operación de homogenización la leche se pasa a través de un equipo denominado homogeneizador, el cual consta de émbolos que generan presión cuando fluye a través de éste determinada cantidad de leche y dando como resultado la fragmentación uniforme de las

partículas o grumos de grasa en un tamaño discrecional para que no se separen de la emulsión. (Galván Díaz, 2005)

4.6 DESCREMADO

En esta etapa el fin es la separación parcial o total del contenido de materia grasa de la leche. El equipo empleado en esta operación se denomina descremadora, cuyo funcionamiento se basa en el principio de la centrifugación, siendo similar su diseño al de un clarificador. La temperatura óptima para el descremado es de 30 °C a 35 °C. (Mosquera Laverde, 2008)

4.7 TRATAMIENTO TÉRMICO (PASTEURIZACIÓN Y REFRIGERACIÓN)

La pasteurización es el proceso térmico realizado a alimentos líquidos (en este caso, a la leche) con el objetivo de reducir los agentes patógenos como: bacterias, protozoos, mohos, levaduras, etc., alterando lo menos posible su estructura física, sus componentes químicos y sus propiedades organolépticas. Durante una pasteurización eficiente se logra la destrucción del 95 a 99% de microorganismos presentes en la leche. (Statsenko & Guharay, 2015)

La etapa de pasteurización es realizada en intercambiadores de calor, compuestos de varias placas metálicas onduladas o con nerviaciones, rectangulares o circulares, cuya disposición por lo general es vertical. Las placas están unidas entre ellas por juntas de goma y situadas en un soporte, que en ocasiones es un sitio de almacenamiento de agua caliente. El espacio que separa cada dos placas consecutivas (de unos 3 o 4 mm) es recorrido por la leche; el elemento calefactor, agua o vapor a baja presión, circula a contracorriente por los espacios paralelos inmediatos. (Galván Díaz, 2005)

La pasterización es un tratamiento térmico cuyo objetivo es destruir microorganismos patógenos que afecten la salud de los consumidores, pero también incluye microorganismos que alteran la calidad del producto. La pasteurización se lleva a cabo por diferentes métodos (Lizcano Moreno et al., 2009):

- Altas temperaturas por corto tiempo (Mínimo 72°C por 15 segundos).
- Bajas temperaturas por largo tiempo (Mínimo 63°C por 30 minutos).
- O cualquier otra combinación de condiciones de tiempo y temperatura con la que se obtenga un efecto equivalente.

Inmediatamente después del calentamiento, la leche se refrigera protegida de la atmosfera en refrigeradores tubulares o de placas cuyo fundamento es el mismo al de los pasteurizadores, ya que la única variación consiste en la sustitución del agua caliente por un fluido refrigerante. Las actividades de limpieza de los pasteurizadores y de los refrigerantes se realizan en circuito cerrado con ayuda de algunos detergentes especiales, que además evitan la formación de piedra de leche y enjuagues con sanitizantes como yodo. (Galván Díaz, 2005)

4.8 ENVASADO

Luego del pasteurizado y enfriamiento, la leche es vertida en un tanque totalmente desinfectado que tiene la capacidad de almacenamiento suficiente y balancea el abasto de las llenadoras distribuyendo el producto hasta las válvulas de llenado. (Galván Díaz, 2005)

5. MINIMIZACIÓN DE RIESGOS ASOCIADOS A *Listeria Monocytogenes*

5.1 DIAGNÓSTICO DE RIESGOS

Factores Contaminantes	Descripción/Recomendación	Etapas del Proceso de Elaboración
Materia prima	<p>La leche contaminada con <i>Listeria monocytogenes</i> puede contaminar equipos, otra leche e instalaciones. Concentraciones mayores a 10^5 UFC/g de <i>Listeria monocytogenes</i> en la leche cruda permitirán la sobrevivencia de la bacteria después de la pasteurización. La leche debe filtrarse inmediatamente después de la recepción para eliminar partículas que pueden vehicular el microorganismo (suciedad, partículas de pienso, polvo, etc.)</p>	Recepción
Instalaciones	<p>En los depósitos de agua, pisos, drenajes y cuartos fríos se favorece la sobrevivencia y persistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> y la posible formación de biopelículas. Se deben realizar reparaciones locativas para evitar la formación de depósitos de aguas e implementar un adecuado programa de limpieza y desinfección, para prevenir la formación de biopelículas en áreas de etapas producción</p> <p>Las zonas con alto contenido de humedad favorecen la formación de biopelículas. Se debe evitar el uso de difusores de aire que puedan presentar acumulación de agua.</p>	Todas las etapas
Equipos y utensilios	<p>El uso de materiales porosos favorece la persistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en las plantas. Los filtros y líneas de conducción son puntos de contaminación. Se deben usar equipos y utensilios de materiales apropiados como acero inoxidable que faciliten la limpieza y desinfección. La presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en el cuarto frío constituye una fuente potencial de re-contaminación del producto terminado. En equipos de refrigeración se debe tener control de la calidad microbiológica del agua refrigerante.</p>	Todas las etapas
Personal	<p>Los manipuladores pueden ser una fuente de diseminación durante el proceso, por contacto directo o indirecto.</p> <p>Dentro de las actividades a considerar están, recibir capacitación permanente sobre buenas prácticas higiénicas, Chequeo médico periódico, uso de ropa de trabajo como gorros, guantes, botas, delantales, tapabocas, etc., aseo personal permanente y riguroso. (Statsenko & Guharay, 2015).</p>	Todas las etapas
Proceso	<p>Mantener el control de la temperatura y los tiempos de proceso</p> <p>La refrigeración no impide la multiplicación de <i>Listeria monocytogenes</i>, pero mientras más baja la temperatura, más lenta será su multiplicación. La temperatura de recepción y almacenamiento no debe ser mayor a 4°C.</p>	Todas las etapas Recepción y almacenamiento

	<p>Un proceso inapropiado de pasteurización, un equipo dañado u operado incorrectamente pueden permitir que <i>Listeria monocytogenes</i> sobreviva. Este es el principal punto de control durante el proceso, por tal razón es de gran importancia su monitoreo. Debe garantizarse la temperatura y tiempo de pasteurización. (Valor D de la leche a 72°C es de 2,7 segundos y a 63°C es de 43 segundos).</p>	
	<p>La resistencia de <i>Listeria monocytogenes</i> a tratamientos térmicos moderados (alrededor de 60°C) es superior a la de otros patógenos como Salmonella, mostrando tiempos de reducción decimal (el llamado valor D) sustancialmente superiores. A partir de los 70°C, los tiempos de reducción decimal de <i>Listeria monocytogenes</i> se igualan o incluso son inferiores a los de Salmonella, indicando que <i>Listeria monocytogenes</i> es más sensible a los incrementos de temperatura. En términos generales se considera que el tiempo de reducción decimal a la temperatura de referencia de 70°C (D70) para <i>Listeria monocytogenes</i> es del orden de 0,33 min, y el valor z, del orden de 6 a 7,5. A partir de estos, se estima que los valores de pasteurización, para reducir 6 unidades logarítmicas la carga del patógeno, se lograrían aplicando 70°C durante 2 min o bien una letalidad equivalente (Bover-Cid & Garriga, 2014).</p>	<p>Pasteurización</p>
	<p>Períodos de tiempo prolongados posteriores a la pasteurización de la leche o del producto terminado pueden favorecer la multiplicación del microorganismo. El enfriamiento de la leche hasta 32 °C, después de la pasteurización debe hacerse en el menor tiempo posible, al igual para el producto terminado que es llevado a refrigeración (2-4°C)</p>	<p>Enfriamiento después de la pasteurización</p>
<p>Limpieza y Desinfección</p>	<p>Los procesos de limpieza y desinfección deficientes y/o la ausencia de programas de limpieza y desinfección favorecen la formación de biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i> en superficies que no entran en contacto con el producto como pisos y drenajes y en superficies de contacto como equipos y utensilios. La presencia del microorganismo en medio ambiente contribuye a la contaminación del producto durante el proceso y a la recontaminación de producto terminado. Se debe evitar la formación de incrustaciones que favorecen la generación de biopelículas, mediante la aplicación de agentes quelantes y ablandadores. Utilizar desinfectantes eficaces y estableciendo la rotación de los mismos, esta rotación debe establecerse de acuerdo a la frecuencia y volumen de producción</p>	<p>Pre operacional</p>

Tabla 13. Factores de riesgo en el proceso de leche pasteurizada. Con base en las etapas de elaboración se indican los principales factores de contaminación y diseminación de *Listeria monocytogenes* durante el proceso y en el producto terminado. Adaptado de: (Instituto Nacional de Salud (INS), 2011)

5.1.1 Determinación de puntos de muestreo

Para determinar los puntos de muestreo se tiene que considerar todo el proceso productivo desde las materias primas hasta el producto terminado, pasando por el producto en proceso, los ambientes de todas las zonas de la planta procesadora, así como todas superficies, tanto de contacto como de No contacto. (Betelgeux, 2013)

Muestreo	Breve Descripción
Cuando	Selección de los lugares de muestreo: Según historial de cada empresa y el proceso productivo. Debe incluir: <ul style="list-style-type: none">- Superficies de contacto con alimentos RTE (más frecuencia)- Superficies de no- contacto con alimentos RTE- Ambiente (más ocasional)
Dónde	Momento de realizar el muestreo: Nunca inmediatamente después de la limpieza y desinfección. Para incrementar la probabilidad de detectar una cepa persistente es recomendable: <ul style="list-style-type: none">- Durante el procesado- Después de mínimo 2h de producción- Final de la tanda de producción
Cómo	Muestreo diario o bien rotativo (no siempre el mismo día de la semana) Dispositivo para la toma de muestra: <ul style="list-style-type: none">- Gasa / toallita / esponja o escobilla (por áreas pequeñas o de difícil acceso)- Seco (para áreas húmedas) o bien húmedo (para áreas secas) Diluyente: Soluciones estériles sin neutralizante, excepto si se espera la presencia de residuos de desinfectantes (ejemplo después de la limpieza y desinfección) Área: Lo más extensa posible. Recomendable entre 1000- 3000 cm ² (evitar uso de plantillas que podrían contribuir a diseminar la contaminación)

Tabla 14. Resumen de recomendaciones para el muestreo de áreas y equipos. Resumen de las recomendaciones para el muestreo de áreas y equipos usados para la producción de alimentos listos para el consumo (RTE). Fuente: (Bover-Cid & Garriga, 2014)

5.2 EVITAR ENTRADA DEL PATOGENO EN LA PLANTA

5.2.1 Homologación de proveedores

Es la manera ideal de abordar el muchas veces espinoso asunto de las garantías sanitarias que debe poseer una materia prima. Se realizará para ello una o varias visitas a las instalaciones del proveedor; se comprobarán sus formas de trabajo; se le exigirá que disponga de sistemas de control escritos que le permitan garantizar la idoneidad sanitaria de los productos que elabora, cuya documentación deberá estar a nuestra

disposición en todo momento o con la frecuencia que se fije en el contrato de aceptación como proveedor. Incluso, podría hacerse algún control analítico. Se debe exigir ciertas características a las empresas de las que proceden las materias primas, envases y embalajes, en cuanto a especificaciones microbiológicas del producto en sí, especificaciones del envase, especificaciones del transporte, que recogen los requisitos exigidos para que los productos no sufran alteración o contaminación durante el mismo: tipo y características del vehículo, temperatura durante el transporte, condiciones de estiba, limpieza, etc., especificaciones de documentación. Abarca aspectos como las autorizaciones del proveedor, certificaciones o resultados de análisis, etc. (Gobierno Vasco, n.d.)

5.2.2 Control de plagas

El Manejo Integrado de Plagas puede ser definido como la utilización de todos los recursos necesarios, por medio de procedimientos operativos estandarizados, para minimizar los peligros ocasionados por la presencia de plagas, es un sistema proactivo que se adelanta a la incidencia del impacto de las plagas en los procesos productivos. (CHEMOTECNICA, 2013)

El mejor control de plagas es el que se basa en la prevención. (Statsenko & Guharay, 2015) Las plagas más comunes, como las moscas y los roedores, son capaces de contaminar e inutilizar grandes cantidades de alimentos. Las plagas actúan como vectores de enfermedades, son capaces de llevar consigo agentes tales como bacterias, virus y protozoos, que son responsables de un sin número de afecciones. Para garantizar la inocuidad de los alimentos, es fundamental protegerlos de la incidencia de las plagas mediante un adecuado manejo de las mismas. ((SAGPyA), 2002)

La presencia de plagas es inaceptable tanto en las áreas de recepción, elaboración como en las de despacho. Constituyen una “suciedad” que contamina y muchas veces es fuente de propagación de enfermedades ETAS (Enfermedades transmitidas por alimentos). Los programas de manejo integrado de plagas MIP llevan a una reducción en el uso de plaguicidas mediante un enfoque más preciso de los procedimientos de control de plagas. (Martínez Pinzón, Rueda Silva, Díaz Salamanca, & Flórez, 2012)

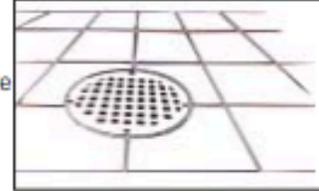
El manejo integral de plagas debe contemplar el diagnóstico de las instalaciones y la identificación de aquellos sectores de riesgo, el monitoreo, el mantenimiento e higiene que contempla las medidas preventivas y el control físico, como por ejemplo las lámparas de insectos y las trampas, la aplicación de productos químicos y por último la etapa de verificación. ((SAGPyA), 2002)

❑ Limpiar todos los restos de comidas en superficies o áreas al finalizar cada día.

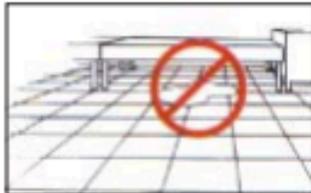
❑ Limpiar la grasa retenida en las zonas de cocina.



❑ Barrer los suelos, inclusive debajo de las mesadas y las máquinas, especialmente cerca de las paredes.



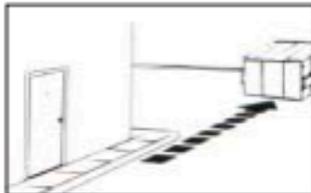
❑ Limpiar los desagües.



❑ Limpiar toda el agua estancada y derrames de bebidas cada noche

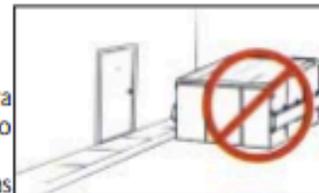
❑ Recoger trapos, delantales, servilletas y manteles sucios. Lavar los elementos de tela con frecuencia.

❑ No guardar cosas en cajas de cartón y en el suelo. Guardar las cajas en estantes de alambre y en estantes de metal si es posible.

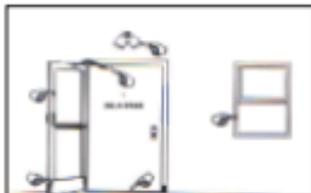


❑ No depositar la basura en cercanías de la planta.

❑ Mantener cerradas las puertas exteriores. Las puertas que quedan abiertas para la ventilación deben contener un alambrado de tejido fino para evitar el ingreso de insectos voladores.



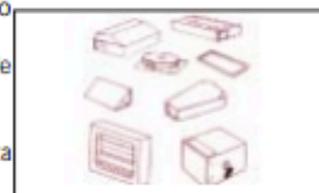
❑ Utilizar telas de alambres para las aberturas que dan al exterior.



❑ Reemplazar las luces blancas por luces amarillas (atraen menos los insectos por la noche) en las entradas de servicio y de distribución.

❑ No mover los aparatos de lucha contra las plagas instalada por la empresa o grupos dedicados al manejo integral de plagas.

❑ Comunicar la presencia y ubicación de los insectos al responsable del control de plagas.



Con la aplicación de estas acciones creamos condiciones adversas lo cual dificulta el desarrollo de las distintas plagas.

Figura 17. Medidas Preventivas en el control de plagas. Son medidas que deben realizarse en forma continua a los fines de minimizar la presencia de plagas. Fuente: ((SAGPyA), 2002)

5.2.3 Formación de personal

Es clave en el control de *Listeria monocytogenes* el personal manipulador de alimentos, debido a que son una de las principales fuentes de contaminación y para reducir la posibilidad de que un manipulador contamine un alimento, éstos han de tener una formación acorde al puesto de trabajo que desempeñan. Un programa de formación de manipuladores de alimentos ha de tener, entre otros, los siguientes aspectos básicos, criterios de apreciación de seguridad alimentaria, signos de deterioro y alteración de los alimentos, sentido del control higiénico en toda la cadena alimentaria, manipulaciones higiénicas de los alimentos, diseño higiénico de locales y utensilios, hábitos de higiene personal de los manipuladores, etiquetado e información sobre los productos alimenticios, papel de los microorganismos en las enfermedades y en la alteración de los alimentos, método de conservación de alimentos, conocimiento sobre la correcta limpieza y desinfección de útiles e instalaciones, requisitos de los materiales para envasar y tipos de envasado, importancia de la responsabilidad sanitaria de cada trabajador, conocimientos básicos respecto al sistema APPCC. (Lizcano Moreno et al., 2009)

5.2.4 Control de operaciones de mantenimiento y reparaciones

Se deben establecer procedimientos para garantizar que el diseño de la planta, las distintas zonas de producción, los equipos y los materiales, son de características tales que no afectan a la salubridad de los alimentos producidos, organizados de tal forma que se eviten contaminaciones cruzadas y se mantengan en un adecuado estado de conservación. (Lizcano Moreno et al., 2009)

5.3 EVITAR CONTAMINACIONES CRUZADAS

5.3.1 Diseño de instalaciones

Todos los artículos, instalaciones y equipos que entren en contacto con los productos alimenticios deberán estar limpios y:

- a) Su construcción, composición y estado de conservación y mantenimiento deberán reducir al mínimo el riesgo de contaminación de los productos alimenticios.
- b) A excepción de recipientes y envases no reemplazables, su construcción, composición y estado de conservación y mantenimiento deberán permitir que se limpien perfectamente y, cuando sea necesario, que se desinfecte en la medida necesaria para los fines perseguidos.
- c) Su instalación permitirá la limpieza adecuada de la zona circundante.

Las máquinas previstas para ser utilizadas con productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos se deben diseñar y fabricar de forma que se eviten los riesgos de infección, enfermedad o contagio. (Unión Europea (UE), 1993)

Se debe garantizar siempre la ausencia de depósitos, facilidad de desmantelamiento y montaje, accesibilidad, cumplimiento en drenaje y superficies exteriores:

La ausencia de depósitos, se refiere a la no acumulación de alimentos en depósitos u otras zonas muertas en los que pueda generarse un crecimiento bacteriano. Por ello, las superficies en contacto con el alimento deben ser no porosas, lisas y pulidas. En principio, la rugosidad de las superficies en contacto con los alimentos debe ser $Ra=0,8 \mu\text{m}$. Pueden aceptarse rugosidades mayores siempre que estén claramente especificadas, dando por supuesto que los tiempos de limpieza deben aumentarse. Así mismo, debe indicarse que en la industria de bebidas se admiten rugosidades de hasta $Ra = 1,6 \mu\text{m}$. Por otra parte, hay que evitar los ángulos, grietas y cortes mediante la curvatura adecuada que evite la acumulación del alimento y facilite la limpieza. Además, las soldaduras que se realicen serán continuas y lisas y se evitarán los finales muertos y los tubos en T. Por último, no debe permitirse la utilización de tornillos en las zonas en contacto con los alimentos pues propician su acumulación. Si por alguna razón extraordinaria se requiriera algún tipo de tornillo, su cabeza será semiesférica y se situará en el lado que contacta con el alimento.

El diseño debe permitir un fácil desmantelamiento de las partes principales, para una limpieza, en tiempos relativamente cortos, seguida del nuevo montaje del equipo. Por ello, el número de piezas de trabajo del equipo de procesado debe ser el menor posible. Así mismo, para facilitar la limpieza, se utilizarán sistemas fáciles de soltar, como por ejemplo palomillas y tornillos de paso de rosca ancho o también abrazaderas y muelles de unión.

Las superficies y componentes de la maquinaria de elaboración de alimentos deben ser fácilmente accesibles para su inspección, de forma que al ser sometidos a los procedimientos establecidos de limpieza y desinfección se consiga un resultado adecuado. En este sentido, si el sistema de limpieza es automático, su eficacia debe ser similar al sistema manual. Las separaciones entre máquinas, o de éstas con las paredes deberán ser como mínimo de 45 cm. Además, el equipo se situará a una distancia del suelo de, al menos, 20 cm. Todo ello con vistas a facilitar la limpieza, inspección y mantenimiento. Las grandes plantas de procesado de alimentos, caso de los túneles de deshidratación y de enfriamiento por aire, tendrán puertas que faciliten el acceso para la limpieza y mantenimiento (diámetro mínimo: 60 cm).

El diseño del equipo en contacto con los alimentos tiene que ser de tal forma que facilite el drenado total, no sólo de los alimentos, sino también de los productos o agentes de limpieza, al objeto de evitar zonas de acumulación que generarían el correspondiente peligro sanitario. Por ello, los sistemas de drenaje se diseñarán de forma que eviten salpicaduras, se puedan limpiar fácilmente y dispongan de la inclinación adecuada para posibilitar la salida de efluentes.

Las superficies exteriores tienen la función primordial de protección por lo que, como siempre, su diseño evitará la acumulación de suciedad y facilitará la limpieza. En líneas generales, al diseñar el equipo hay que separar los mecanismos tales como grupo motor, reductor, transmisor, ..., siempre más difíciles de limpiar en todos los sentidos, de las zonas en las que se exige una limpieza estricta. Sin embargo y, a pesar de lo anterior, los motores estarán protegidos por una carcasa estanca y no oxidable, con el adecuado acabado superficial, dejando el espacio suficiente entre la bancada y el motor para facilitar la limpieza. Además, las transmisiones de potencia deben solucionarse de forma que se evite la contaminación del alimento. (Castañeda Martín, 2010)

5.3.2 Circuitos y flujos de producción

Aplicar flujo de aire de partes limpias (zonas RTE) a sucias (materia prima). La planta debe establecer una metodología para identificar totalmente los flujos de personal. (Quinceno Orozco & Zuluaga García, 2012)

Las áreas de trabajo deben estar por compartimientos en equipamiento, utensilios de limpieza y personal y se debe evitar aerosoles y condensaciones, así como tampoco limpiar utensilios en el suelo. (Garriga, Aymerich, & Bover-Cid, 2013)

5.4 ELIMINAR Y/O EVITAR FORMACIÓN DE BIOFILMS

5.4.1 Buen diseño higiénico y mantenimiento de las instalaciones

Mejorar el diseño higiénico de los equipos para evitar que se formen nichos de microorganismos.

- Forma.
- Materiales.
- Acabados.

Diseños que faciliten una limpieza adecuada: locales, maquinaria y equipos, cintas transportadoras, etc. (Betelgeux, 2013)

El material sanitario por excelencia es el acero inoxidable el cual está compuesto de Hierro (Fe); Níquel (Ni) y Cromo (Cr) y algunos otros componentes. El Acero inoxidable no es resistente al ataque químico o físico. La resistencia a la corrosión del acero depende de la formación de la “película pasiva superficial”. La cual está compuesta de óxidos de cromo y níquel. La pasivación tiene dos objetivos:

- 1- Remover el hierro “libre” que queda en la superficie después del proceso de fabricación del acero ya que la presencia de este y la exposición al oxígeno presente en el aire provoca las manchas de óxido (corrosión) que debilitan el acero.
- 2- Reforzar la película de óxido de cromo que es la evita que las moléculas de oxígeno penetren la superficie del acero inoxidable.

La película pasiva se crea de forma natural en el proceso de fabricación del acero, pero esta se ve afectada cuando el acero se somete a los procesos de montaje, corte, soldadura, etc., por reacciones químicas o por contracción o expansión debido a fuerte calentamiento o enfriamiento. Por esto es necesario recuperarla para que la superficie no se afecte en los procesos posteriores a los cuales se va a exponer como lo son, en fabricación de bebidas.

5.4.2 Sistemas de monitorización en línea

Según (Hernández Puga, 2016), una vez formados los biofilms, la actuación eficaz de las herramientas de control es bastante más difícil:

Durante el tiempo que ha pasado hasta que ha sido percibido el biofilm, este ha ido consolidándose y adquiriendo capacidad para adaptarse a las circunstancias adversas encontradas en esa localización, incluidas las propias estrategias de limpieza y desinfección aplicadas. Por tanto, poder actuar antes, permitiría un control más sostenible y eficaz. Para que esa detección precoz sea posible, son necesarios sistemas de monitorización. Los sistemas de detección temprana de biofilm se basan en la instalación en determinados puntos conflictivos de la planta, de sensores que generan información de forma automática. Frente a estos nuevos sistemas de monitorización, los procedimientos usados hasta ahora incluyen tinciones específicas in situ y muestreos, mediante torundas o cupones depositados en la

superficie, a intervalos de tiempo establecidos para cada caso, para obtener el recuento de células viables, comúnmente mediante técnicas de siembra tradicionales.

5.4.3 Limpieza y desinfección

Listeria Monocytogenes crece en condiciones de humedad y la presencia de nutrientes lo favorece aún más. Este microorganismo es detectado en plantas procesadoras de productos lácteos comúnmente en zonas con presencia de humedad, entre ellas, zonas con condensamiento y agua estancada, desagües, equipos de proceso, etc.

El programa de limpieza y sanitización debe contemplar las condiciones que permitan eliminar o reducir *Listeria Monocytogenes* hasta niveles aceptables, pues, aunque tiene poca resistencia a los desinfectantes, su capacidad de formar biofilms es excepcional y esto lo confiere gran resistencia al calor, la desecación y a la acción de los agentes químicos empleados en la limpieza y sanitización. Esta bacteria se puede establecer y subsistir en los desagües del suelo, por lo que éstos deberán ser limpiados y sanitizados para evitar la contaminación cruzada, pero este proceso de limpieza debe ser realizado en horas no productivas ni con mangueras de alta presión que dispersen el microorganismo

El equipo y los útiles utilizados para la limpieza y desinfección, deben mantenerse en perfecto estado de conservación y limpieza para que no sean una fuente de contaminación. El equipo de limpieza debe ser exclusivo para cada zona de productos crudos y de productos terminados, y ser fácilmente identificables. (Lizcano Moreno et al., 2009)

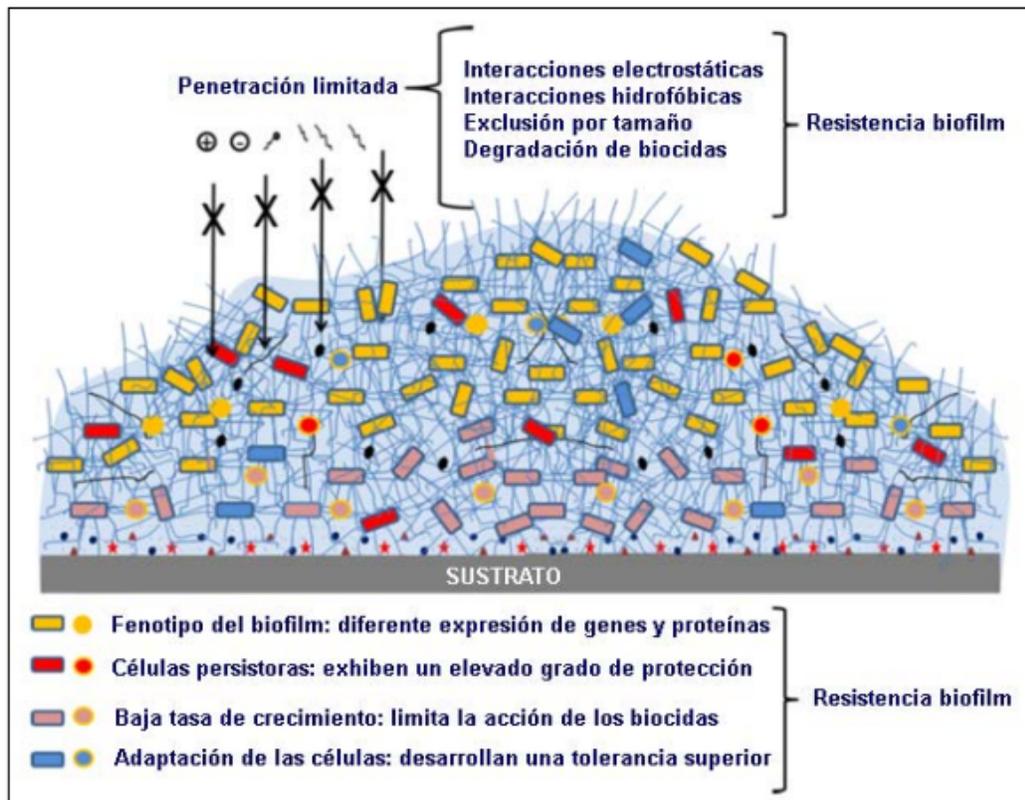


Figura 18. Mecanismos implicados en la resistencia frente a antimicrobianos en los biofilms. Fuente: (Hernández Puga, 2016)

La desinfección es la reducción en mayor o menor medida de la población microbiana mediante el empleo de ciertos productos químicos denominados desinfectantes. Estos pueden desactivarse por la presencia de detergentes. Por eso, para que la desinfección sea efectiva, primero se debe haber llevado a cabo una limpieza exhaustiva. (Bedoya Mejía, 2012)

Los productos usados para la desinfección deben tener un sistema de rotación para evitar la resistencia de *Listeria monocytogenes* a estos productos. Se recomiendan los Amonios cuaternarios ácidos, no neutros. Productos con ácido peracético. Derivados de cloro (dióxido de cloro, hipoclorito). (Garriga et al., 2013)

Se recomienda implementar un sistema básico de limpieza CIP en dos fases (una alcalina y una ácida) incluye las siguientes etapas, (Lizcano Moreno et al., 2009):

- Recuperación de residuos de producto mediante drenaje, arrastrándolos con agua.
- Eliminación de restos de leche o productos, mediante enjuague con agua fría o caliente.
- Eliminación de las grasas adheridas en el sistema mediante limpieza con una solución alcalina caliente (con aditivos para evitar la corrosión del sistema).
- Enjuague para eliminar la solución alcalina.
- Eliminación de los restos sólidos adheridos a los equipos mediante una solución ácida de ácido clorhídrico, nítrico o fosfórico (con aditivos para evitar la corrosión del sistema).
- Enjuague para eliminar los restos de ácido.
- Desinfección siempre y cuando sea necesario, con una solución química (por ejemplo, hipoclorito, yodoformo, agua oxigenada), o mediante vapor o agua caliente.
- Para evitar la contaminación cruzada, no se deben dejar restos de materia orgánica, ni superficies húmedas.

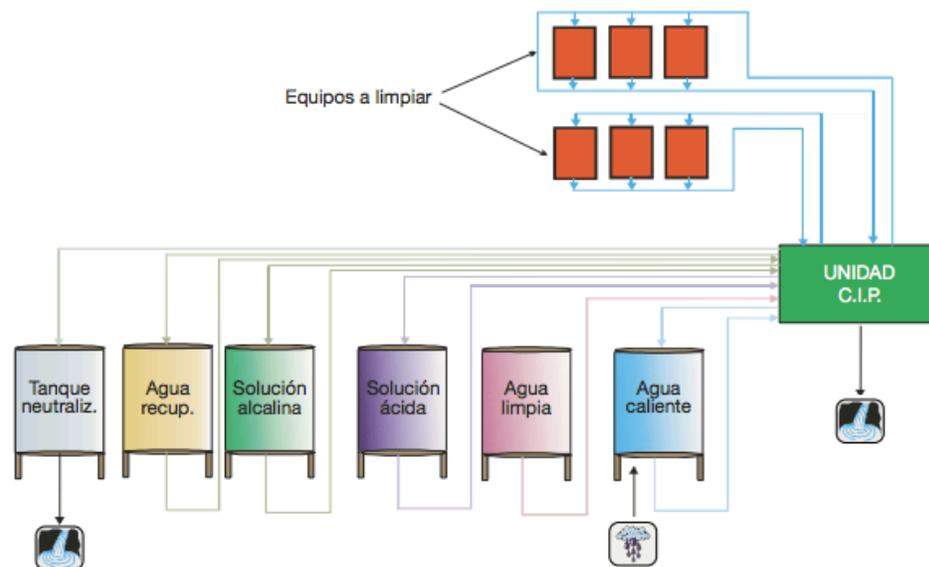


Figura 19. Diagrama de Limpieza CIP. La unidad central de un sistema CIP está constituida por: depósitos de almacenamiento de los productos detergentes concentrados, depósitos de agua limpia, bombas de recirculación, depósito de recuperación del agua de aclarado (si existe recuperación) y otros sistemas para la preparación de soluciones. Fuente: ((CAR/PL), 2002)

Los estudios realizados a escala de laboratorio establecen que la eficacia de estos sistemas depende de la cantidad de suciedad presente, del número de ciclos de limpieza programados, y el método utilizado. De hecho, dado que los sistemas CIP tradicionales usando agentes químicos parecen mejorables, el empleo de enzimas en este tipo de sistemas, es una opción a considerar. (Hernández Puga, 2016)

5.4.4 Verificar procedimientos de limpieza y desinfección

Los procesos de limpieza y desinfección se pueden verificar empleando varios métodos; el primero es una inspección visual, que consiste en observar si existen restos de suciedad, lo que evidenciaría que no fue suficiente la actividad realizada. Este método está sujeto a la subjetividad del observador. El segundo es el muestreo de superficies para análisis microbiológico, donde de acuerdo al crecimiento o no del microorganismo se evalúa si los procedimientos están siendo efectivos. El tercero son los sistemas de evaluación indirecta: son sistemas que detectan indirectamente la presencia de microorganismos sobre las superficies, sin implicar la visualización directa de los mismos. Por ejemplo, la bioluminiscencia, basada en la detección de ATP, u otras técnicas basadas en la detección de proteínas. Control del pH del agua de aclarado tras la etapa de desinfección de maquinaria y utensilios, para comprobar que no quedan restos en los circuitos de los productos químicos empleados en la limpieza y desinfección que pudieran contaminar los alimentos. (Lizcano Moreno et al., 2009)

5.5 CONTROLES DE PROCESO

5.5.1 Parámetros intrínsecos

Cuando se establecen las características de un producto y las condiciones bajo las cuales será envasado y almacenado, se deben comparar con las que existen respecto a la capacidad de supervivencia o crecimiento de *Listeria monocytogenes*. (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN), 2011)

Factor	Puede Crecer			Puede Sobrevivir, pero no crecer
	Límite Inferior	Óptimo	Límite Superior	
Temperatura (°C)	-1,5 a 3,0	30,0 a 37,0	45,0	-18,0
pH	4,2 a 4,3	7,0	9,4 a 9,5	3,3 a 4,2
Actividad de agua (a_w)	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	<0,90
Concentración de sal (%)	<0,5	0,7	12 a 16	\geq 20
Atmósfera	Es un anaerobio facultativo que puede crecer en ausencia de oxígeno, por ejemplo, envasado al vacío o atmósfera modificada			

Tabla 15. Factores que limitan la supervivencia y crecimiento de *Listeria monocytogenes*. La Temperatura, el pH, la actividad acuosa, la concentración de sal y la atmósfera son los factores limitantes de *Listeria monocytogenes*.

5.5.2 Proceso de producción

Se deberá hacer una revisión del diagrama de tuberías de la empresa y compararse a la disposición real de la planta, y se debe investigar todos los posibles cruces de conexiones. No se permiten cruces de conexiones entre el producto crudo y pasteurizado ni entre Sistema de limpieza in situ. La pasteurización, procesamiento, enfriamiento y empaque de leche y productos lácteos deben realizarse en una sala separada de las instalaciones de limpieza y desinfección de camiones tanque de leche y otras áreas en las que se manipule la leche cruda y los utensilios para la leche cruda. La pasteurización debe realizarse siguiendo las relaciones de tiempo/temperatura. (Food and Drug Administration (FDA), n.d.)

5.5.3 Post-procesado

El proceso de empaque debe ser inspeccionado exhaustivamente ya que la contaminación con *Listeria monocytogenes* suele darse después del tratamiento térmico (pasteurización), y esta inspección debe incluir, la revisión de exceso de grasa y/o lubricante, la presencia de condensación en áreas de proceso que pudiesen generar contaminación en recipientes abiertos antes o después del llenado y la entrega de los empaques debe ser por un proveedor autorizado. (Food and Drug Administration (FDA), n.d.)

5.5.4 Vida útil prevista y condiciones de conservación y uso

Los responsables de la producción de alimentos tienen la obligación de ejecutar acciones a tiempo, que garanticen que no exista en el producto presencia de *Listeria monocytogenes*, y que no haya crecimiento hasta el fin de la durabilidad declarada en el empaque. Por lo tanto, el productor debe tener conocimiento documentado sobre la factibilidad y la sensibilidad del alimento frente a *Listeria monocytogenes*, y tal información debe ser un insumo a la hora de establecer la vida útil del producto. (Iñigo Nuñez & Jiménez Manso, 2012)

6. CONCLUSIONES

Se establecieron e identificaron las diferentes intoxicaciones asociadas a la contaminación con *Listeria monocytogenes*, a través de una descripción general del microorganismo y la respectiva contextualización de la listeriosis como enfermedad transmitida por los alimentos.

Se describieron las principales características de *Listeria monocytogenes*, destacando su capacidad de formación de biopelículas y los factores que determinan esta formación, como son las propiedades fisicoquímicas de la superficie, la disponibilidad de nutrientes, entre otros.

Se especificaron las técnicas de diagnóstico de *Listeria monocytogenes*, las cuales son de vital importancia en la monitorización del microorganismo en las plantas procesadoras de alimentos porque de la rapidez y confiabilidad de los resultados depende el éxito en las acciones implementadas para el control del microorganismo.

Se caracterizó el proceso productivo de la leche pasteurizada, describiendo cada una de las etapas, sirviendo como punto de referencia para el planteamiento de las estrategias para minimizar los riesgos asociados a *Listeria monocytogenes*.

Se describieron estrategias para minimizar los riesgos asociados a *Listeria monocytogenes* enfocadas en el procesamiento de leche pasteurizada, a través de la realización de una revisión bibliográfica de literatura reconocida y actualizada en el campo científico, basadas en los principios de APPCCP y BPM.

La contextualización y el conocimiento de los peligros asociados a *Listeria monocytogenes*, constituyen una base importante para establecer las estrategias a seguir para el control del microorganismo en las plantas de procesamiento de leche pasteurizada.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda la implementación de las estrategias propuestas en este documento para validar las medidas de control y determinar su efectividad en la minimización de los riesgos asociados a *Listeria monocytogenes*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (CAR/PL), C. de A. R. para la P. L. (2002). *Prevención de la contaminación en la Industria Láctea*. Barcelona, España. Retrieved from www.cprac.org/docs/lac_es.pdf
- (SAGPyA), S. de A. G. P. y A. de A. (2002). Boletín de Difusión. Manejo integrado de plagas en el sector agroalimentario. Retrieved from http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/publicaciones/calidad/BPM/Manejo_plagas_2002.pdf
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. *Revista Del Comité Científico de AESAN*, 14(3), 43–63. Retrieved from https://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir2949/listeria_vida_til_05_final.pdf
- Aymerich, T. (2010). Detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos. IRTA. Retrieved from http://www.recercat.cat/bitstream/handle/2072/47952/Aymerich_Alimentaria_2010.pdf?sequence=3
- Baquero, J. (2008). *Efectos de tratamientos térmicos en combinación con los aceites esenciales de clavo y tomillo sobre la supervivencia de Listeria monocytogenes evaluada in vitro y en una sopa comercial*. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from <http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis149.pdf>
- Barrera Hernández, M. V. (2015). *Caracterización de la resistencia a germicidas en cepas de Listeria monocytogenes aisladas de espinaca (Spinacea oleracea)*. Universidad Autónoma de Querétano. Retrieved from <http://ri.uaq.mx/handle/123456789/3026>
- Bedoya Mejía, V. (2012). *Diseño e implementación del programa de trazabilidad y mejoramiento del programa de calidad en la empresa alimentos LAM S.A.S.* Corporación Universitaria Lasallista. Retrieved from http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/803/1/Trazabilidad_calidad_Alimentos_LAM.pdf
- Bello, H., Vera, A., González, G., & Domínguez, M. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation. *Revista Chilena Infectol*, 30(4), 407–416. Retrieved from <http://www.scielo.cl/pdf/rci/v30n4/art10.pdf>
- Betelgeux. (2013). Estrategias de control de *Listeria monocytogenes* persistente. Retrieved from http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/Enrique_Orihuel_-_Estrategias_de_control_de_Listeria_monocitogenes_persistente.pdf

- Biomérieux Industry. (2013). VIDAS, una tecnología de alto rendimiento. Retrieved from <http://jornades.uab.cat/workshopmrama/sites/jornades.uab.cat/workshopmrama/files/VIDAS.pdf>
- Bover-Cid, S., & Garriga, M. (2014). Investigación sobre las condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Retrieved from https://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3122/informe_listeria_irta_2014_es.pdf
- Buchanan, R., Lindqvist, R., Ross, T., Smith, M., Todd, E., & Whiting, R. (2004). *Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo. Resumen Interpretativo*. Retrieved from ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4_es.pdf
- Cadena Moreno, E. E. (2011). *Estudio de la formación de Biopelículas de Listeria monocytogenes EDGe sobre superficies de vidrio y acero inoxidable y su control*. Universidad Autónoma de Querétaro. Retrieved from <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/1649/1/RI001175.pdf>
- Callejo, R., Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, F., & Martínez, G. (2008). *Manual de Procedimientos. Aislamiento, identificación y caracterización de Listeria monocytogenes*. WHO Global Salm-Surv. Retrieved from http://bvs.panalimentos.org/local/file/Manual_Listeria_monocytogenes_2008.pdf
- Castañeda Martín, E. (2010). Diseño higiénico del equipo de procesado de alimentos (pp. 303–383).
- CHEMOTECNICA. (2013). Consejos para la implementación de Programas de Manejo Integrado de Plagas en la industria alimentaria. *Enfoques de Salud Ambiental*. Retrieved from http://www.chemotecnica.com/sgc/files/Newsletter_MARZO.pdf
- Domínguez Carmona, M. (2010). Listeriosis. Una zoonosis emergente de transmisión alimentaria. Retrieved from <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1112/1129>
- Esquivel Hernández, J. J. (2015). *Incidencia, distribución y control de listeria monocytogenes durante el procesamiento de espinaca precocida y congelada*. Universidad Autónoma de Querétano. Retrieved from <http://ri.uaq.mx/handle/123456789/2672>
- European Food Safety Authority (EFSA), & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2014). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12(2), 312. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>
- Federación Colombiana de Ganaderos (FEDEGAN). (2015). *Análisis y Perspectivas del Sector Ganadero Colombiano*. Bogotá. Retrieved from

<http://www.fedegan.org.co/estadisticas/publicaciones-estadisticas>

- Folleco Villareal, Á. E. (2014). *Informe final enfermedades transmitidas por alimentos, 2014*. Bogotá . Retrieved from [http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe de Evento Epidemiológico/ETA 2014.pdf](http://www.ins.gov.co/lineas-de-accion/Subdireccion-Vigilancia/Informe%20de%20Evento%20Epidemiologico/ETA%202014.pdf)
- Food and Drug Administration (FDA). (n.d.). Productores de Productos Lácteos (4/95). Guía para las inspecciones a productores de productos lácteos. Retrieved from <http://www.fda.gov/downloads/ICECI/UCM280461.pdf>
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria - ELIKA. (2011). Patógenos Alimentos-Información Consumidor-Consumidor:Seguridad Alimentaria e Higiene Alimentaria ELIKA. Retrieved from http://www.elika.eus/consumidor/es/preguntas_patogenos.asp
- Gallego, L. (2013). Aspectos prácticos de control y prevención de *Listeria monocytogenes*. Presente y Futuro. In *Jornada Técnica Listeria monocytogenes*. Madrid: Analiza Calidad. Retrieved from http://www.betelgeux.es/images/files/Externos/02_Luis_Gallego_-_Conferencia_Listeria_Luis_Gallego_11-2013.pdf
- Galván Díaz, M. del P. (2005). El proceso Básico de la leche y el queso. *Revista Digital Universitaria*, 6(9), 1–17. Retrieved from http://www.revista.unam.mx/vol.6/num9/art87/sep_art87.pdf
- García, B., & Bermejo, B. (2014). *Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en productos cárnicos listos para su consumo en España*. Universidad Politécnica de Valencia. Retrieved from <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54508/>
- Garriga, M., Aymerich, T., & Bover-Cid, S. (2013). Manual de seguridad alimentaria del sector cárnico porcino: como gestionar los principales peligros. Programa de control de *Listeria monocytogenes*. INNOVACC.
- Gobierno Vasco. (n.d.). Manual Diseño e Implementación APPCC. Retrieved from https://www.euskadi.eus/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/manualDisImplAPPCC_c.pdf
- Hain, T., Ghai, R., Billion, A., Kuenne, C. T., Steinweg, C., Izar, B., ... Chakraborty, T. (2012). Comparative genomics and transcriptomics of lineages I, II, and III strains of *Listeria monocytogenes*. *BMC Genomics*, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-144>
- Hamon, M., Bierne, H., & Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nature Reviews Microbiology*, 4, 423–434.
- Health Canada. Policy on *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Foods [Health Canada,

- 2011] (2011). Retrieved from http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/policy_listeria_monocytogenes_2011-eng.php
- Henriquez Jelves, M. (2011). Control ambiental de *Listeria monocytogenes* en plantas. In *3º Seminario Programa Reducción Patógenos*. Retrieved from <http://historico.sag.gob.cl/common/asp/pagAtachadorVisualizador.asp?argCryptedData=GP1TkTXdhRJAS2Wp3v88hDP0ek0HfZ8xR6XKpmjAB0k%3D&argModo=&argOrigen=BD&argFlagYaGrabados=&argArchivoId=36906>
- Heredia, N., Dávila-aviña, J. E., Soto Solís, L., & García, S. (2014). Productos cárnicos: principales patógenos y estrategias no térmicas de control Meat products: main pathogens and non-thermal control strategies. *Nacameh*, 8(1), 20–42. Retrieved from http://cbs.izt.uam.mx/nacameh/v8s1/Nacameh_v8s1_20-42Heredia-et-al.pdf
- Hernández Puga, C. (2016). *Simulación y control de biofilms portadores de "Listeria monocytogenes" en la industria alimentaria*. Universidad Complutense de Madrid. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/38812/1/T37648.pdf>
- Herrera Dután, N. Y. (2016). *Guía de implementación de la normativa BPM, en el diseño civil, construcción y montaje de una planta procesadora de lácteos para AGALEC*. Universidad del Azuay. Retrieved from <http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/5726/1/12046.pdf>
- Ibañez Martí, C. (2008). Listeriosis por *Listeria monocytogenes*: un reto para la Salud Pública. Retrieved from http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2008/09/01/99837
- Instituto Nacional de Salud (INS). (2011). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. Retrieved from <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Er-listeria-en-lpc.pdf>
- Iñigo Nuñez, S., & Jiménez Manso, A. (2012). Guía de estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumo. Retrieved from www.madrid.org
- Larraín De La C, D., & Carvajal, J. (2008). Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de *Listeria monocytogenes* a través de la barrera placentaria. (Una revisión bibliográfica). *Revista de La Universidad Católica de Chile*, 33(1), 20–30. Retrieved from <http://publicacionesmedicina.uc.cl/Boletin/20081/AspectosFisiopatologicos.pdf>
- Liu, D. (2013). Molecular approaches to the identification of pathogenic and nonpathogenic listeriae. *Microbiology Insights*, 6, 59–69. <https://doi.org/10.4137/MBI.S10880>
- Lizcano Moreno, L., López de la Torre, C., Roldán Trujillo, C., Ercilla Herrero, Á., Rodríguez García, F., & Santero Sánchez, M. J. (2009). *Manual de aplicación del*

sistema APPCC en industrias lácteas de Castilla-La Mancha. Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha y CECAM. Retrieved from http://ics.jccm.es/uploads/media/Manual_de_aplicacion_del_sistema_APPCC_en_industrias_lacteas_de_Castilla-La_Mancha.pdf

- Martínez Pinzón, O. A., Rueda Silva, J., Díaz Salamanca, J. C., & Flórez, H. (2012). Manejo Integrado de Plagas en la Industria de Alimentos. *Palmera Junior*. Retrieved from <https://palmerajunior.wordpress.com/2012/09/25/manejo-integrado-de-plagas-en-la-industria-de-alimentos/>
- Martínez Rivera, S. (2014). *Capacidad deterioradora y de formación de biopelículas de bacterias ácido lácticas de una planta procesadora de jamón cocido rebanado y su interacción con Listeria monocytogenes*. Universidad Autónoma de Queretano. Retrieved from <http://ri.uaq.mx/bitstream/123456789/3367/1/RI001539.pdf>
- Medrano, M. V., Restrepo, S., & Vanegas, M. C. (2006). Tipificación molecular de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y alimentos. *Biomédica*, 26(3), 442–450.
- Michanie, S. (2013). *Listeria monocytogenes*. La bacteria emergente de los 80. *Ganados & Carnes*, 4(18), 34–37. Retrieved from http://bpmyhaccp.com.ar/publicaciones/2.Listeria_monocytogenes.pdf
- Moreno Ocampo, P. A. (2013). *Serotipificación molecular y susceptibilidad antimicrobiana de Listeria monocytogenes, aislada de carne y derivados de origen porcino, en el departamento del Tolima*. Pontificia Universidad Javeriana. Retrieved from http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/9801/1/MorenoOcampoPaolaAndre_a2013.pdf
- Mosquera Laverde, W. E. (2008). Producción de leche entera. Retrieved from http://datateca.unad.edu.co/contenidos/332569/MODULO_332569_EXE/produccion_de_leche_entera.html
- Muñoz, A. I. (2012). Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos, Colombia, 2000-2009. *Biomédica*, 32(3), 408–17. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.709>
- Muñoz Delgado, A. B., Chaves, J. A., Rodríguez, E. C., & Realpe, M. E. (2013). *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. *Biomédica*, 33(2), 283–91. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v33i2.716>
- Orellana, H. (2011). Biofilms en Seguridad de Alimentos. Retrieved from <http://www.alimentosyseguridad.blogspot.com.co/2011/01/proximamente-llega-el-verano-y-con-el.html>

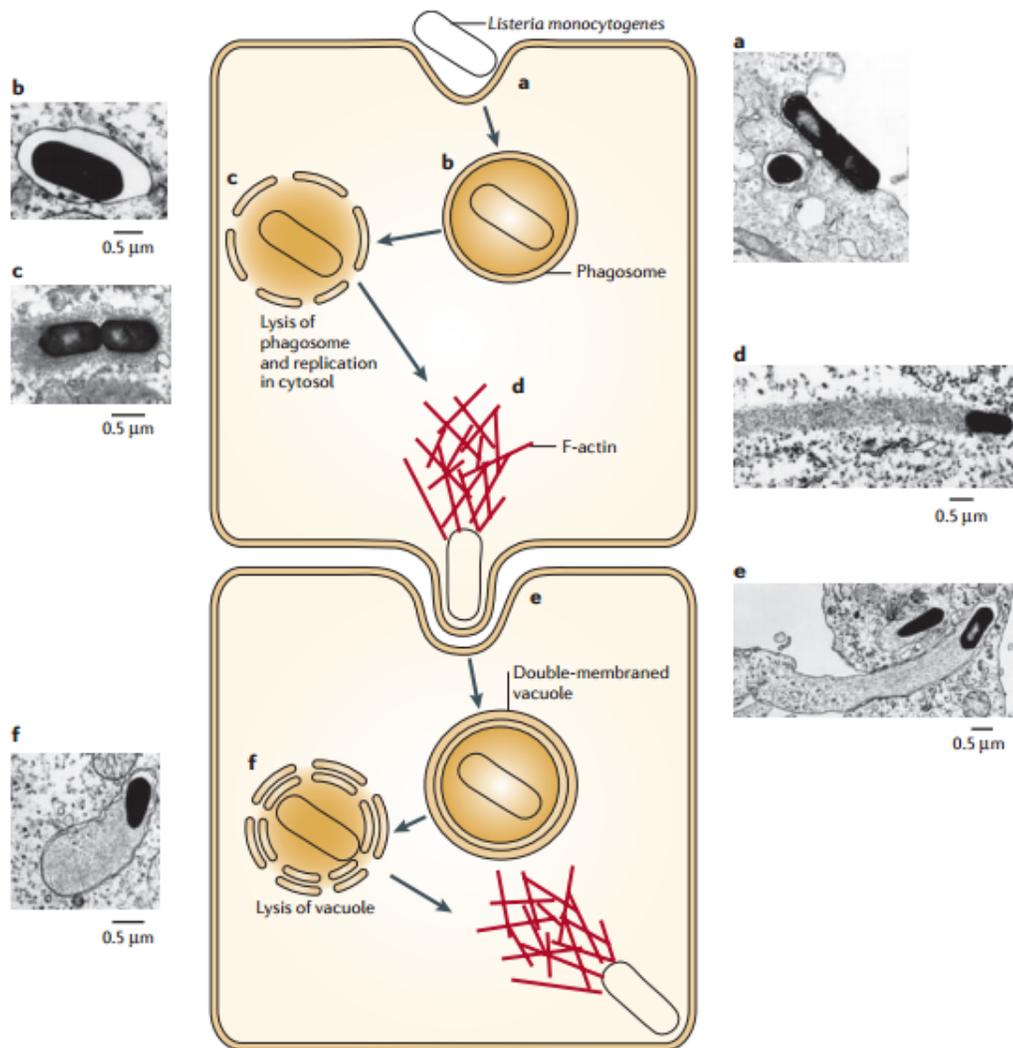
- Orihuel Iranzo, E. J., Bertó Navarro, R., Canet Gascó, J. J., & Cartón, F. L. (2014). *El Control de Listeria monocytogenes persistente en industrias alimentarias*. BETELGEUX. Retrieved from http://www.betelgeux.es/images/files/Documentos/AET_-_Articulo_Tecnico_L__Monocytogenes_Persistente.pdf
- Ortiz Jareño, M. del S. (2016). *Diversidad genética y persistencia ambiental de Listeria Monocytogenes en dos plantas de procesamiento de carne de cerdo ibérico: influencia de la resistencia a desinfectantes de amonio cuaternario*. Universidad Complutense de Madrid. Retrieved from <http://eprints.ucm.es/38371/1/T37495.pdf>
- Quinceno Orozco, O. D., & Zuluaga García, N. (2012). *Propuesta de mejoramiento para la distribución de planta en una empresa del sector lácteo*. ICESI. Retrieved from http://bibliotecadigital.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/73152/1/propuesta_mejoramiento_planta.pdf
- Rodas, O. R. (2009). *Caracterización Bioquímica y molecular de Listeria monocytogenes*. Universidad Autónoma Metropolitana. Retrieved from <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI14837.pdf>
- Ruiz-Bolivar, Z., Poutou-Piñales, R. A., & Carrascal-Camacho, A. K. (2008). Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria spp.* *NOVA*, 6, 101–236.
- Sánchez Rodríguez, J. A., Serrano Jiménez, S., Marfil Navarro, R., & Jodral Villarejo, M. L. (2009). *Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino*. Díaz de Santos. Retrieved from <http://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788479789220.pdf>
- Sánchez V, F. J., Mata, V., Espinoza, A., & Villarreal, L. (2006). Incidencia de especies de listeria en una planta productora de alimentos congelados. *Ciencia UANL*, 9(1), 51–56. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/402/40290110.pdf>
- Schöbitz, R., Ciampi, L., & Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *AGRO SUR*, 37(1), 1–8. Retrieved from <http://mingaonline.uach.cl/pdf/agrosur/v37n1/art01.pdf>
- Statsenko, L., & Guharay, F. (2015). *Procesamiento de leche y elaboración de productos lácteos*. Retrieved from https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/70088/Manual_de_procesamiento_de_productos_lacteos_CRS_USDA_CRS_2015.pdf?sequence=4&isAllowed=y
- Stoodley, P., & Dirckx, P. (2003). Biofilm migration. Center for biofilm engineering. Retrieved from <http://www.biofilm.montana.edu/content/biofilm-migration>
- Tan, W., Wang, G., Pan, Z., Yin, Y., & Jiao, X. (2015). *Listeria monocytogenes* strain NTSN, complete genome. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP009897>

- Téllez Peña, S. (2012). Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria. *VISAVET*. Retrieved from <https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php#>
- Unión Europea (UE). DIRECTIVA 93/43/CEE DEL CONSEJO de 14 de junio de 1993 relativa a la higiene de los productos alimenticios (1993). Retrieved from http://www.euresp-plus.net/sites/default/files/resource/Directiva_93-43-CE.pdf
- United States Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Service (FSIS). (2014). FSIS Compliance Guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products. Retrieved from <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577-e74a1e549fde/Controlling-Lm-RTE-Guideline.pdf?MOD=AJPERES>
- Vanegas, C. (2008). Importancia de patógenos emergentes en la inocuidad alimentaria. *Alimentos*, 5, 34–35.
- Vanegas Molina, E. (2015). *Investigación Bibliográfica: Biopelículas en la industria procesadora de productos lácteos*. Universidad de Concepción. Retrieved from <http://hdl.handle.net/123456789/330>
- Vila Brugalla, M. (2014). *Listeria monocytogenes* en comidas preparadas. *Seguridad Alimentaria*, (230), 69–77.
- Villanueva Durand, D. A. (2015). *Capacidad de formación de biopelículas de cepas de Listeria monocytogenes aisladas de quesos frescos procedentes de mercados del Cercado de Lima*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Retrieved from http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4431/1/Villanueva_dd.pdf
- World Organization for Animal Health. (2009). *Listeria monocytogenes*. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (pp. 1238–1254). Retrieved from http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf
- World Organization for Animal Health. (2014). *Listeria monocytogenes*. In *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (8th ed.). Retrieved from http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.09.07_Listeria_monocytogenes.pdf
- World Organization for Animal Health (OIE). (2008). *Listeria monocytogenes*. In *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009* (pp. 1238–1254). Retrieved from http://web.oie.int/eng/normes/MANUAL/2008/pdf/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf
- Zumbado Gutiérrez, L., & Romero Zuñiga, J. J. (2016). Conceptos sobre inocuidad en la

producción primaria de la leche. *Revista de Ciencias Veterinarias*, 33(2), 51–66.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15359/rcv.33-2.1>

ANEXOS

ANEXO A. Representación del ciclo de vida de *Listeria monocytogenes*.



a) *Listeria monocytogenes* produce su entrada en fagocitos no profesionales. b) Las bacterias son internalizadas en una vacuola (también se conoce como un fagosoma). c) y d). La membrana de la vacuola se ve interrumpida por la secreción de dos fosfolipasas, PLCA y PlcB, y la toxina formadora de poros listeriolisina O. Las bacterias se liberan en el citoplasma, donde se multiplican y comienzan a polimerizar la actina, como se observa por la presencia de las colas características de actina. e) La polimerización de la actina permite que las bacterias pasen a las células vecinas mediante la formación de protuberancias en la membrana plasmática. f) A la entrada en la célula vecina, las bacterias presentan una vacuola de doble membrana, de la que puede escapar para perpetuar el ciclo. F-actina, Actina filamentosa.

Fuente: (Hamon, Bierne, & Cossart, 2006)

ANEXO B. Formación y Movilidad de los Biofilms.

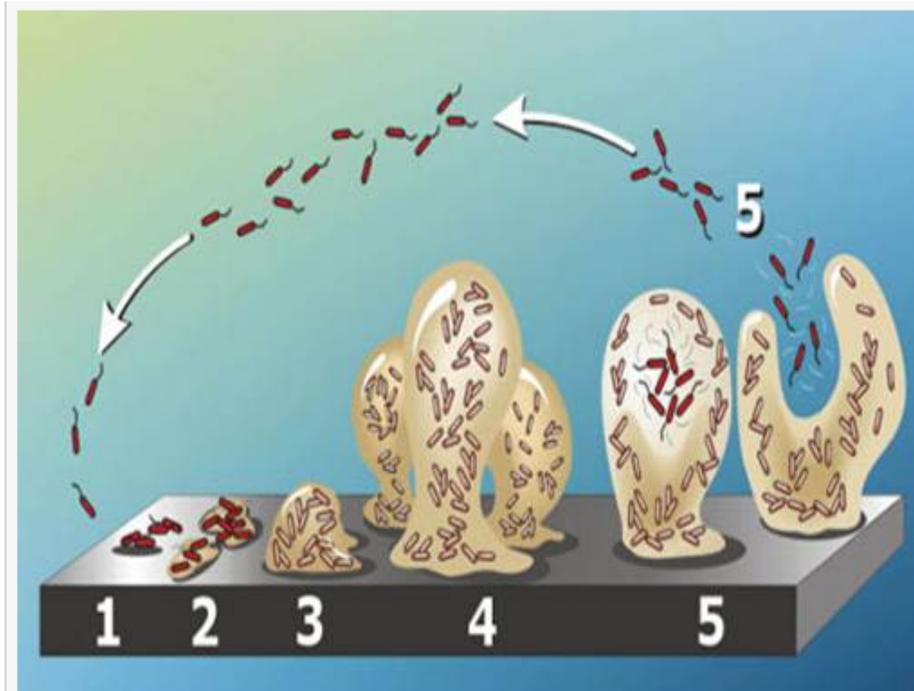
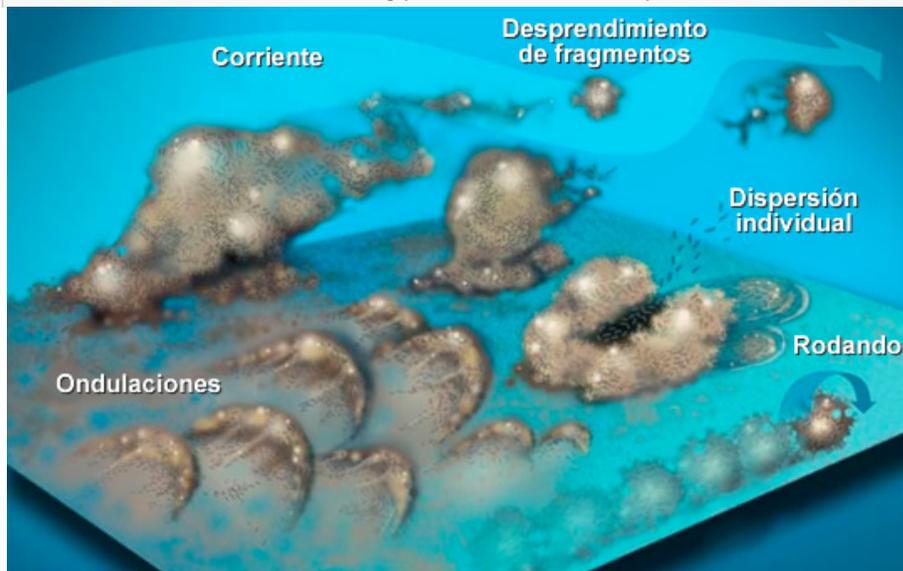


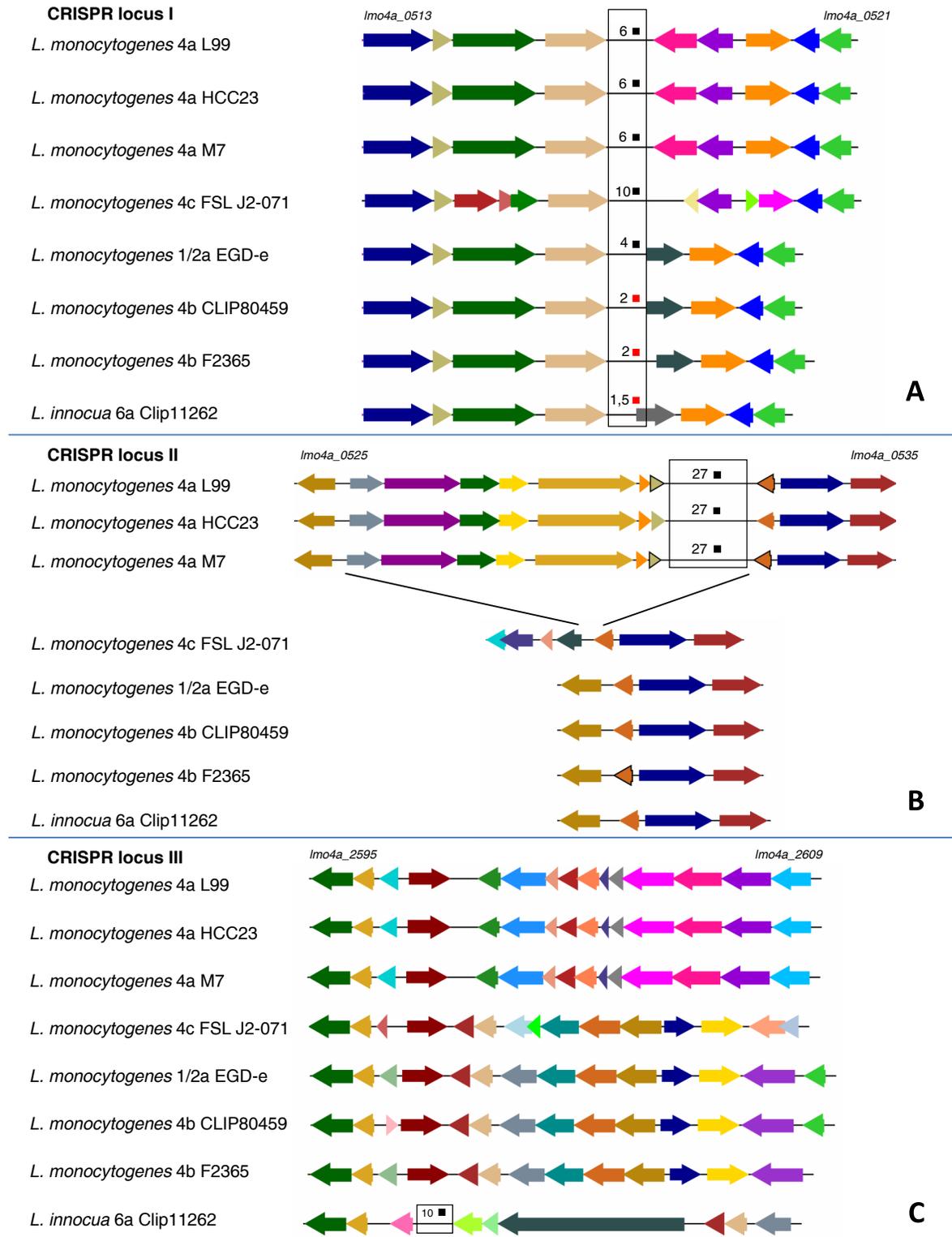
Imagen que muestra la formación de una biopelícula bacteriana. Las bacterias se agrupan en estructuras complejas. Cuando la biopelícula está madura un porcentaje de la población está en forma libre y puede colonizar otras superficies.



La movilización de *Listeria monocytogenes* en el biofilm se puede dar de de dos maneras, colectiva e individualmente. Cuando se da colectivamente se hace en ondulaciones, rodando sobre la superficie o desprendiéndose en grupos. Cuando se da individualmente lo realiza dispersándose en la corriente.

Fuente: (Stoodley & Dirckx, 2003)

ANEXO C. Linajes de *Listeria monocytogenes*



Fuente: (Hain et al., 2012)

ANEXO C. Sistemas Comerciales para la Detección Rápida de *Listeria*
Convencionales y basados en anticuerpos

Prueba	Nivel ID	Principio	Tiempo aproximado de la prueba ²	Compañía	Utilización principal
MICRO-ID <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes/innocua</i> complejo	Reacción enzimática	24 horas	Organon Teknika	Confirmación
Vitek System	<i>L. monocytogenes/innocua</i> complejo	Pruebas bioquímicas	24 horas	bioMérieux	Confirmación
API <i>Listeria</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Pruebas bioquímicas	24 horas	bioMérieux	Confirmación
MicroLog System	<i>L. monocytogenes</i>	Uso de sustratos como fuente de carbono	4 o 24 horas	Biolog	Confirmación
MICROBACT 12L	<i>L. monocytogenes</i>	Utilización de carbohidratos y prueba de microhemólisis	4–6 o 24 horas	Microgen	Confirmación
Sherlock Microbial Identification System (MIS)	<i>L. monocytogenes/innocua</i> complejo	Patrones de ácidos grasos	90 minutos	Microbial ID	Confirmación
Microscreen	<i>Listeria</i> spp.	Aglutinación con látex	1 minuto	Microgen BioProducts	Confirmación
VIP <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Inmuno-cromatografía	2 minutos (después del enriquecimiento)	BioControl Systems	Detección
Dynabeads anti- <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Separación inmunomagnética	48–72 horas	Dynal	Detección
REVEAL para <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	Inmuno-cromatografía	43 horas	Neogen	Detección
Clearview <i>Listeria</i> (Prueba rápida para Oxoid <i>Listeria</i>)	<i>Listeria</i> spp.	Inmuno-cromatografía	43 horas	Oxoid	Detección
Listertest	<i>Listeria</i> spp.	Separación inmunomagnética	24–48 horas	Vicam	Detección

ELISA

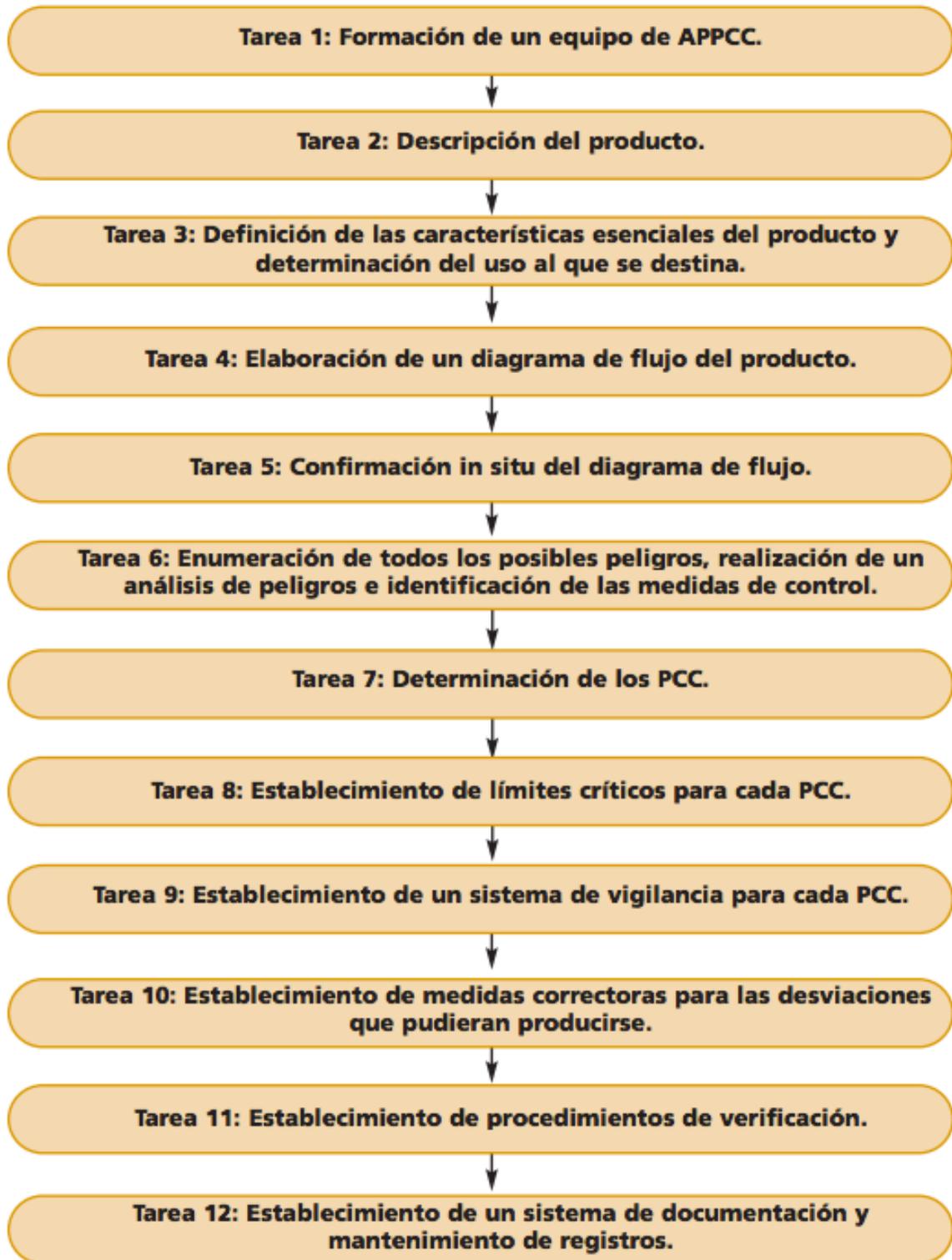
Prueba	Nivel ID	Principio	Tiempo aproximado de la prueba ²	Compañía	Utilización principal
<i>Listeria</i> Tek	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	Organon Teknika	Detección
Inmunoensayo visual TECRA para <i>Listeria</i> (TLVIA)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	TECRA	Detección
Assurance <i>Listeria</i> EIA	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	BioControl Systems	Detección
VIDAS <i>Listeria</i> (LIS)	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	bioMérieux	Detección
VIDAS <i>Listeria monocytogenes</i> (LMO)	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 horas	bioMérieux	Detección
Transia Plate <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA	50 horas	Diffchamb	Detección
Transia Plate <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	ELISA	50 horas	Diffchamb	Detección
EIAFOSS <i>Listeria</i>	<i>Listeria</i> spp.	ELISA automático	48 horas	Foss Electric	Detección

Moleculares

Prueba	Nivel ID	Principio	Tiempo aproximado de la prueba ²	Compañía	Utilización principal
Gen-Probe (AccuProbe)	<i>L. monocytogenes</i>	Sonda para hibridación de ácido nucleico	30 minutos	Gen Probe	Confirmación
VIT Listeria Kit	<i>L. monocytogenes</i> / <i>Listeria</i> spp.	Sonda para hibridación de ácido nucleico	3 horas	Vermicon	Confirmación
Foodproof <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Biotecon Diagnostics	Detección
Gene Trak <i>Listeria</i> Assay	<i>Listeria</i> spp.	Sonda para hibridación de ácido nucleico	50 horas	Gene Trak	Detección
Prueba Gene Trak para <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Sonda para hibridación de ácido nucleico	50 horas	Gene Trak	Detección
BAX para la detección de <i>L. monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Qualicon	Detección
BAX para la detección de <i>Listeria</i> Genus	<i>Listeria</i> spp.	PCR	48 horas	Qualicon	Detección
PROBELIA	<i>L. monocytogenes</i>	PCR	48 horas	Sanofi Diagnostics Pasteur	Detección
Kit de detección LightCycler foodproof <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i>	PCR en tiempo real	65 minutos ³	Roche Applied Science	Detección
Kit de detección LightCycler foodproof <i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria</i> spp.	PCR en tiempo real	75 minutos ³	Roche Applied Science	Detección

Fuente: (World Organization for Animal Health, 2009)

ANEXO E. Aplicación de los principios del sistema APPCC



Fuente: (Lizcano Moreno et al., 2009)