

Estudio microbiológico de *Listeria monocytogenes* en cámaras de maduración. Evaluación del protocolo de Sanitización vigente.

M.V. HERNAN ISEQUILLA

Director: M.V. Mg. JULIO COPES

Trabajo Integrador Final

Carrera de Especialista en Seguridad Alimentaria

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

CONTENIDO

Página

Introducción

Generalidades de Listeria spp.

Patogenicidad

Fenotipo

Taxonomía

Epidemiología de la Listeriosis

Distribución en el medio ambiente

Transmisión

Los alimentos como fuente de infección

Patogenia

Manifestaciones clínicas

Tratamiento

Legislación alimentaria

Diagnostico microbiológico

Prevención en plantas productoras de alimentos.

Sistema de Gestión de Inocuidad en planta productoras de alimentos.

El análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP)

Prerrequisitos, las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y

los Procedimientos Operativos Estandarizados de

Saneamiento (POES).

Requisitos POES

Ejemplo de construcción del Documento

Título de la propuesta de trabajo

Objetivo del trabajo

Materiales y métodos

Resultados y discusión

Conclusión

Bibliografía

Introducción

Generalidades de *Listeria* spp.

Listeria monocytogenes es un microorganismo patógeno en animales domésticos causante de abortos y mastitis. En el caso del hombre es una zoonosis bacteriana asociada con el consumo de alimentos contaminados, que llegan a ser fatales en individuos susceptibles. Las características más importantes a la hora de evaluar el riesgo que implica la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos son su ubicuidad, la capacidad para desarrollar a temperaturas de refrigeración, su tolerancia a concentraciones elevadas de sal y la resistencia a los ácidos. Su nombre proviene del cirujano inglés Joseph Lister, y de la capacidad que posee éste microorganismo a través extractos de su membrana, de estimular la producción de monocitos en conejos. A raíz de las epidemias en vacas y en ovejas causadas por la ingesta de silos contaminados, se ha logrado entender el origen y la vía de transmisión de la enfermedad en humanos. En los últimos años, *Listeria monocytogenes* ha sido una preocupación para la industria alimentaria. Las epidemias recientes y la presión de los medios de comunicación, han influenciado sobre los Organismos de Regulación y Control de alimentos para la búsqueda de metodologías de prevención de Listeriosis (Altekruse y col. 1997, Ciesilski y col. 1988, Smith y col. 2009).

En la última década el género *Listeria* se ha expandido hasta incluir 17 especies con diversas características fenotípicas y genotípicas. La caracterización de las últimas 9 especies descritas desde 2009, incluyendo análisis genómico comparativo, han provisto un nuevo enfoque y dejan ver la necesidad de reevaluar la taxonomía del actual género *Listeria*.

Actualmente el género *Listeria* incluye 17 especies reconocidas (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, and *L. booriae*) de cocobacilos Gram positivos, de las cuales solamente dos (*L. monocytogenes* y *L. ivanovii*) son consideradas patógenas.

Hasta 2009 la última especie identificada de *Listeria* fue *L. ivanovii* (Seeliger y col., 1984). A partir de 2009 han sido descritas once especies de *Listeria* (*L. marthii*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, and *L. booriae*) (Orsi y col. 2016).

Se sugiere la organización del género *Listeria* en dos categorías que son: *Listeria sensu strictu* que incluye *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, y *L. innocua*, y *Listeria sensu lato* que incluye las otras 11 especies de las cuales ninguna se describe como patógena (Orsi y col. 2016, Hmaied y col. 2014, Huang y col. 2013).

Listeria monocytogenes continúa siendo la especie más importante que puede ocasionar enfermedad. Es uno de los patógenos más importantes que causa enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) en humanos. Si bien *L. monocytogenes* es la única descrita como patógeno alimentario, en la industria de alimentos se utiliza el diagnóstico de *Listeria monocytogenes* y de *Listeria* spp como indicador de condiciones que permiten la presencia, adhesión, desarrollo y persistencia de *L. monocytogenes* (Orsi y col. 2016, Ramage C y col. 1999).

En su constitución, *Listeria* spp. posee antígenos somáticos (O) y flagelares (H), los cuales permiten su clasificación en serotipos; la principal especie patógena, *L. monocytogenes* se clasifica en 13 serotipos: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7, todos ellos son productores de Listeriosis. A pesar que todos pueden causar enfermedad, el 95% de los aislamientos de casos de infección en humanos pertenecen a los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b. También, éstos son los grupos más frecuentes en los aislamientos de origen alimentario (Pellicer K y col. 2011).

Patogenicidad

L. monocytogenes es un patógeno intracelular facultativo que puede causar enfermedad severa, su morbilidad es baja pero su mortalidad elevada. La sintomatología típica incluye septicemia, abortos y encefalitis. Existen algunos reportes que la Listeriosis humana se ha manifestado con una infección gastrointestinal sin infección sistémica y es causada mayoritariamente por transmisión alimentaria. Además de la infección en humanos, se ha reportado que *L. monocytogenes* causa infección en más de 40 especies animales. *L. ivanovii* también es considerada patógena, relacionada mayoritariamente a enfermedad en animales, con algunos estudios de casos que respaldan la infección en ovejas (Orsi y col. 2016)

Fenotipo

El género *Listeria* comprende bacilos cortos, regulares de 0.4-0.5 μm de diámetro y 0.5-2 μm de largo, Gram positivos, asporógenos y no ácidosresistentes. En montajes de tejido infectado o cultivos líquidos se observan frecuentemente formas cocoides (0.4-0.6 μm de diámetro), por lo que pueden confundirse con estreptococos, de los que se diferencian por la prueba de catalasa. Sin embargo, estas formas cocoides son raramente observadas a partir de cultivos en medios sólidos. Las células se presentan solas, en cadenas cortas o dispuestas entre sí dando forma de "V" o en grupos dispuestas en forma paralela a lo largo de un eje (Seeliger y col. 1986). *L. monocytogenes* es un microorganismo catalasa positivo, oxidasa negativo. Son aerobias, anaerobias facultativas; psicrótrofas, ya que siendo mesófila puede desarrollar también a temperatura de refrigeración. Su temperatura óptima de desarrollo es entre 30 a 37°C. Según el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (1986), *L. monocytogenes* se desarrolla en el rango de pH de 6 a 9. Generalmente se considera que los pH bajos son inhibitorios y hasta letales para la bacteria, sin embargo, se ha indicado que tolera medio ácido hasta pH 4.4. Tolerancia de hasta 20% de NaCl y actividad de agua de (a_w) $\geq 0,90$. No son formadoras de cápsula. Son móviles por 2-3 flagelos peritricos (raramente se observan más de 5 por las técnicas usuales de coloración) que se desarrollan mejor a 20-25°C, en medios semisólidos desarrolla 3-5 mm debajo de la superficie en forma de paraguas invertido. A 37°C pierde la movilidad dado que no desarrollan los flagelos. En agar nutritivo las colonias son de 0.5-1.5 mm de diámetro, redondas, traslúcidas, de convexidad baja y bordes netos. Son de color gris azulada y con un brillo azul verdoso por la luz transmitida oblicuamente. Las cepas recién aisladas muestran colonias circulares, lisas (forma "S"), blancas con superficie brillante (Jay, 2000).

Recientemente se han identificado gran número de aislamientos de *L. innocua* hemolíticas, especie considerada originalmente no patogénica y no hemolítica. Probablemente alguna de estas cepas hayan sido mal clasificadas como *L. monocytogenes* en forma incorrecta previo al uso de métodos moleculares que permiten una caracterización filogenética. *L. innocua* se ha aislado también al menos de un caso humano fatal (Perrin y col. 2003), confirmando que pueden causar enfermedad en el hombre. Si bien existe información que sugiere que algunas cepas de *L. innocua* tienen el potencial para causar enfermedad en humanos, se requieren más investigaciones para determinar si todas o solo algunas *L. innocua* hemolíticas representan un riesgo para el hombre y que factores de virulencia las relacionan con *L. monocytogenes* (Orsi y col. 2016). Resulta importante destacar que la caracterización

Specialización en Seguridad Alimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP

fenotípica no siempre sirve para clasificar en forma precisa los aislamientos de *Listeria* spp. Las características fenotípicas, a veces en combinación con la caracterización genética han permitido describir un gran número de aislamientos de *Listerias* “atípicas” antes y después de 1985, por ejemplo cepas de *L. innocua* hemolíticas podría ser considerada una *Listeria* atípica de la misma manera que han sido descritas un gran número de *L. monocytogenes* atípicas incluyendo algunas no hemolíticas (Orsi y col. 2016).

Debido a que *L. innocua* es identificada por su incapacidad de producir hemólisis y fermentar D-xilosa junto a la capacidad de fermentar glicerol, las cepas hemolíticas de *L. innocua* son difíciles de diferenciar de *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* basado en los análisis bioquímicos estandarizados (Orsi y col. 2016, Sauders B y col. 2012).

El género *Listeria* contiene algunas especies betahemolíticas. *L. monocytogenes* es betahemolítica, mientras que *L. ivanovii* produce una zona muy amplia o múltiples zonas de hemólisis en agar sangre. Si la reacción de betahemólisis es débil o dudosa, puede resolverse mediante la prueba de CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) cuyo fundamento es la potenciación de la actividad hemolítica por los metabolitos de *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi* difundidos en una placa de agar sangre (Lovett y col. 1988).

Taxonomía

Listeria sensu stricto claramente representa un grupo distintivo y bien definido de organismos que deberían mantenerse dentro del género *Listeria*. Las especies actualmente agrupadas en *Listeria sensu lato* por otra parte, parecen confirmar la necesidad de su reclasificación en tres géneros diferentes, debido a que presentan características fenotípicas y genotípicas que las distinguen de *Listeria sensu strictu* (Orsi y col. 2016); la reclasificación en más de un único género además de coincidir con la caracterización filogenética también propone agruparlas en géneros con características únicas y distintas (por ejemplo todas las especies en el propuesto género *Mesolisteria* no pueden desarrollar a 4°C), *L. grayi* podría clasificarse en un género nuevo y diferente denominado *Murraya*, como resurgimiento del género *Murraya* propuesto antiguamente, mientras que *L. fleischmannii*, *L. aquatica* y *L. floridensis* podrían ser clasificadas en un género denominado *Mesolisteria* (por sus propiedades mesófilas). Finalmente *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* y *L. booriae* podrían clasificarse en un nuevo género denominado *Paenilisteria* (aproximación fenotípica) (Orsi y col. 2016).

Epidemiología de la Listeriosis

La Listeriosis se ha convertido en un serio problema de salud pública dado que si bien presenta baja morbilidad y una elevada mortalidad (20 a 30 %) dependiendo del estado inmunológico del paciente, cursando con un largo período de incubación (hasta 6 semanas). La dosis infectiva mínima de *L. monocytogenes* no ha sido aún establecida (FDA, 2009), aunque ha sido indicado que la ingesta de hasta 100 células no afectan la salud de consumidores sanos (Jay, 2000).

La mayoría de los casos de Listeriosis son esporádicos, aunque se han descrito unos pocos brotes comunitarios debidos al consumo de un alimento determinado (ensaladas preparadas, embutidos, quesos blandos, pastel de carne). La Listeriosis aparece con más frecuencia en países templados que en los tropicales. Se han descrito brotes en unidades de neonatología en diferentes países (Saylers y col. 2005).

Las propiedades psicrótrofas de *L. monocytogenes* aumentan su supervivencia en los alimentos, a la vez que juegan un rol importante en la epidemiología de la Listeriosis y la virulencia del organismo. La capacidad de *L. monocytogenes* de resistir condiciones medioambientales estresantes convierte a éste patógeno alimentario en un gran problema para la industria de los alimentos.

Casos de Listeriosis animal debidos a *L. ivanovii* han sido reportados en varios países de Oceanía, América del Norte y América del Sur, Europa y Asia. Si bien no se ha confirmado a *L. ivanovii* como agente causal de Listeriosis humana, se la ha aislado de personas con sintomatología de Listeriosis en países de Europa y Asia (Orsi y col. 2016).

La incidencia anual de casos por Listeriosis es muy baja. Por ejemplo en Europa, varían entre 0,3 y 7,5 por millón de personas (6,2 casos por millón de habitantes en Alemania en el año 2005) y 3 casos por millón en Australia. Según datos del CDC , (*Center for Disease Control and Prevention*) en el año 2008, la incidencia fue de 0,29 casos por cada 100.000 habitantes en Estados Unidos, entre 2016 y marzo de 2017 un brote de Listeriosis en quesos produjo dos muertes con un total de 8 personas hospitalizadas. La Listeriosis presenta un cuadro severo, lo que hace que las personas afectadas busquen atención médica. De esta manera, y como en Estados Unidos es una enfermedad de notificación obligatoria, el CDC estima que se identifican aproximadamente la mitad de todos los casos de ese país (Koch y col. 2010, CDC 2008).

Tanto en Estados Unidos como en Europa durante los últimos diez años han ocurrido brotes de esta ETA cuyo origen han sido en su mayoría alimentos cárnicos y lácteos dejando como consecuencia graves pérdidas económicas y de prestigio para las empresas involucradas. En la UE se registraron unos 1.470 casos humanos en 2011, con una tasa de mortalidad del 12,7% (EFSA, 2013).

Entre los últimos brotes de Listeriosis ocurridos se destaca por su importancia el que tuvo lugar en Canadá en el 2008, originado en las líneas de producción 8 y 9 de *Delimeats* (fiambres) de la fábrica *Maple Leaf Food*. Más de 220 productos presentaron contaminación de *L. monocytogenes* dando lugar a 57 casos de Listeriosis y 23 decesos. Más reciente un brote multiestado en EE.UU. en julio de 2011 que se originó por el consumo de melones cantaloupe contaminados procedentes de la compañía *Jensen Farms* de Colorado. Se cree que fue producido por malas condiciones en el envasado, originó 123 casos repartidos en 26 estados de EE.UU., de los cuales 25 personas fallecieron.

En Argentina, se documentaron numerosos abortos naturales por *L. monocytogenes* incluso mucho tiempo antes que se conociera su transmisión por alimentos (Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud/Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas, ANLIS/INEI, 1999). Sin embargo, en los últimos 30 años, no se describieron ni documentaron brotes alimentarios o casos esporádicos de Listeriosis en los que se haya identificado el alimento como vehículo del microorganismo. Es necesario recordar que en nuestro país la enfermedad no es de notificación obligatoria (Michanie S, 2004).

Distribución en el medio ambiente

Listeria monocytogenes es un microorganismo cosmopolita. Este microorganismo, de carácter ubiquitario se puede encontrar en suelos, vegetales, pastos, explotaciones ganaderas, pudiendo llegar a sobrevivir entre 1 y 2 años en el medio ambiente. Tanto los humanos como los animales pueden actuar como portadores asintomáticos, evidenciándose su presencia en 3 a 30% de los casos evaluados. Se la ha aislado de gran variedad de animales domésticos y salvajes (Aureli y col. 2000)

Las plantas también son una fuente de *Listeria*, interviniendo en muchas infecciones. Se ha aislado *L. monocytogenes* de soja, maíz en descomposición, hierba salvaje y hojas de arbusto. En silos vegetales su incidencia es elevada, sobre todo en aquellos de mala calidad

con un pH elevado, pudiendo resistir en ellos por 10 a 12 años. Muchos casos de Listeriosis animal se atribuyen a los silos como fuente de infección (Czuprynski C, 2005).

Transmisión de la Listeriosis

Resulta evidente que la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos es una de las fuentes de Listeriosis en humanos y constituye una amenaza para la Salud Pública. Los productos de mayor riesgo son aquellos “listos para comer” que se almacenan a temperatura ambiente por períodos de tiempo prolongados (Copes J y col. 2000, Pellicer K y col. 2002).

Los manipuladores de alimentos con infección latente de *Listeria*, se consideran una fuente probable de infección. Sin embargo, es difícil evaluar su presencia en el ambiente. La vía fecal-oral ya sea directa o indirectamente provoca la enfermedad en humanos y animales. Los animales infectados y, a veces sanos, frecuentemente eliminan *Listeria* por materia fecal. El uso de aguas residuales como fertilizante o riego eleva el riesgo de transmitir Listeriosis.

Del mismo modo, la presencia del germen en el suelo o vegetales en descomposición contribuye directa e indirectamente a la contaminación de alimentos. El suelo es un depósito natural de este microorganismo por lo que resulta elevadamente probable que los vegetales se encuentren contaminados. Los abonos animales pueden contaminar el suelo y éste, a su vez, contaminar una cosecha (Beuchat y col. 1997).

Los alimentos como fuente de infección

Actualmente los alimentos son considerados como un medio de transmisión importante en humanos. *L. monocytogenes* y *L. innocua* son las cepas más frecuentemente aisladas de plantas elaboradoras de alimentos; sin embargo, la mayoría de los casos de Listeriosis transmitida por alimentos se deben a la contaminación de alimentos crudos o cocidos con *L. monocytogenes*. En las plantas de producción de alimentos puede encontrarse en el suelo, aguas estancadas, equipos de procesamiento, cintas transportadoras, cámaras de frío y túneles de congelación, entre otros. Su crecimiento en este entorno se ve favorecido por la alta humedad y la presencia de nutrientes. Se ha demostrado que la sobrevivencia de *Listeria* en tablas de plástico y de madera puede ser hasta 90 días (Copes J y col. 2000).

L. monocytogenes puede desarrollar a bajas temperaturas, en un amplio rango de pH, con elevada concentración de NaCl y reducida actividad acuosa; por lo tanto, es capaz de sobrevivir y multiplicarse en una gran variedad de productos alimenticios. Los alimentos más

frecuentemente asociados con brotes y con alto nivel de riesgo son productos cárnicos, quesos y productos lácteos, patés y salchichas, pescados ahumados, ensaladas y en general productos industrializados, refrigerados, listos para el consumo, sin requerimientos de cocción o calentamiento previo. Los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva, así como también en el almacenamiento en frío (Noriega E, 2010).

La particularidad de resistir distintas condiciones de estrés como congelación, secado, acidez y frío, pudiéndose adaptar a éstas mediante la producción de biofilms (Kalmokoff y col, 2001, Kumar G 1998). Esta capacidad supone un problema grave para las empresas alimentarias por la dificultad que presenta su control en las plantas de procesado. Desde el punto de vista de la higiene y la salud alimentaria y pública, *L. monocytogenes* es un organismo prioritario en los planes de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP, por sus siglas en inglés *Hazard Analysis and Critical Control Points*) llevados a cabo en la industria alimentaria, como así también en los planes de prevención de enfermedades de las instituciones sanitarias (Mengoni y col. 2003, ILSI 2005). En plantas de producción de alimentos puede encontrarse en el suelo, aguas estancadas, equipos de procesamiento, cintas transportadoras, cámaras de frío y túneles de congelación, entre otros. Su crecimiento en este entorno se ve favorecido por la alta humedad y la presencia de nutrientes (FAO 2004, Peña S 2010).

Uno de los problemas que enfrenta la industria es que los productos químicos utilizados para higienizar superficies como el ácido peracético, amonios cuaternarios y compuestos clorados no garantizan la eliminación del patógeno o bien pierden su efectividad en presencia de materia orgánica, como es el caso del cloro (Schöbitz R, 2009). Este problema muchas veces se agrava dado que *L. monocytogenes* presenta la capacidad de formar en superficies donde han quedado residuos orgánicos, lo cual dificulta la acción de los higienizantes (Orihuel Iranzo y col. 2014).

Un biofilm es una estructura colectiva de microorganismos que se adhiere a superficies vivas o inertes y está revestida por una capa protectora de exopolisacáridos segregada por los propios microorganismos. Representan un sistema muy eficaz de protección para los microorganismos frente a condiciones ambientales adversas como variaciones de temperatura, agentes antimicrobianos y sustancias sanitizantes (Orihuel Iranzo y col. 2014). La superficie sobre la cual se desarrolla el biofilm tiene importancia en la firmeza de éste para adherirse y también para ser destruido. Pan y col. (2006), demostraron que sobre acero

inoxidable *L. monocytogenes* formaba un biofilm más grueso que sobre teflón; sin embargo, eran más fáciles de eliminar del acero inoxidable. Al comparar biofilm formados sobre goma o polietileno con los desarrollados sobre acero inoxidable se encontró que había mayor dificultad para la destrucción del patógeno sobre la goma y el polietileno, al utilizar desinfectantes en base a cloro o yodo (Orihuel Iranzo y col. 2014, Meza Ramírez L 2016). Este es un antecedente importante a considerar cuando se requiere determinar potenciales puntos de contaminación por el patógeno en la línea de procesamiento de un alimento.

Otra de las vías de transmisión puede ser a través de los manipuladores de alimentos. Como se comentó previamente, *L. monocytogenes* es un residente intestinal temporal en el ser humano ya que el 3% al 11% de la población en algún momento es portadora, sin presentar los síntomas. Ha sido aislada de alimentos sin procesar como leche, carne, vegetales y de alimentos procesados como quesos blandos, helado, manteca, carne procesada, pescado crudo y ahumado en frío. A pesar de encontrarse con frecuencia en alimentos crudos, los casos de listeriosis generalmente se relacionan con aquellos listos para el consumo, los que se conservan refrigerados por un periodo prolongado de tiempo o con los contaminados post procesamiento térmico (Copes J y col. 2002, Pellicer K y col. 2002).

Aunque esta enfermedad no es de notificación obligatoria en Argentina, es importante destacar que se han documentado numerosos abortos naturales por *L. monocytogenes* incluso mucho tiempo antes que se conociera su transmisión por alimentos.

Patogenia

L. monocytogenes se considera un parásito intracelular facultativo, se disemina protegido de las defensas del huésped, incluyendo anticuerpos y complemento, e ingresa en el hospedador de forma primaria a través del intestino. En los últimos años, se notificaron un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave de este ciclo de vida intracelular. Estos determinantes de virulencia comprenden, entre otros, las internalinas, la listeriolisina O (LLO, codificada por el gen *hly*), la proteína Act A, dos fosfolipasas, una metaloproteasa, la proteína Vip, un sistema de exclusión de la bilis (BilE) y una hidrolasa de sales biliares. El ciclo incluye la fagocitosis inducida por el propio patógeno, la lisis de la vacuola fagocítica, el movimiento en el citoplasma y la diseminación a las células vecinas.

La patogenicidad de *L. monocytogenes* va a depender de la capacidad del microorganismo de adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células no fagocíticas (enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas). La entrada

de *L. monocytogenes* y la colonización de los tejidos del hospedero se lleva a cabo en cuatro etapas:

a. Cruce de la barrera intestinal: Antes de alcanzar el intestino las células de *L. monocytogenes* ingeridas tienen que soportar el ambiente adverso del estómago. Al menos 13 proteínas de estrés oxidativo y 14 proteínas de “shock” tóxico, son inducidas bajo condiciones de estrés en *L. monocytogenes*.

b. Multiplicación en el hígado: Las células de *Listeria* cruzan la barrera intestinal a través de la linfa y la sangre hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, el bazo y el hígado. Infecciones experimentales de ratones por vía intravenosa han mostrado que *L. monocytogenes* es retirada rápidamente de la corriente sanguínea por los macrófagos residentes en el bazo y el hígado.

c. Colonización de útero grávido y feto: El aborto y la muerte del neonato han sido reproducidos experimentalmente por inoculación intravenosa, oral y respiratoria en animales gestantes susceptibles, como ovinos, bovinos, conejos, cobayos, ratones y ratas, de esta manera se demostró que *L. monocytogenes* accede al feto por penetración hematogena de la barrera placentaria. En ratones grávidos, la bacteria primero invade la membrana basal y progresa hacia el vello placentar, donde causa infiltración inflamatoria y necrosis.

d. Invasión del cerebro: en humanos, la infección del sistema nervioso central se presenta en forma de meningitis. Sin embargo, esta meningitis está asociada frecuentemente con la presencia de focos infecciosos en el parénquima cerebral, especialmente en el tallo cerebral lo que sugiere que *L. monocytogenes* tiene tropismo por el tejido nervioso (Vera A y col. 2013).

La razón por la que *L. monocytogenes* causa infección está explicada en la capacidad para inducir fagocitosis en células del sistema mononuclear fagocítico, seguida de la replicación dentro de estas y la transferencia directa a células vecinas. El ciclo de infección se divide en cuatro etapas: Internalización, Evasión de la vacuola intracelular, Nucleación de filamentos de actina y Expansión de célula a célula.

A. Internalización: El ciclo comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la subsecuente penetración de la bacteria dentro de la célula hospedadora, *L. monocytogenes* es tomada por las células del hospedero a través de fagocitosis.

B. Evasión de la vacuola intracelular: Una vez que *L. monocytogenes* ha sido fagocitada por un macrófago, en pocas horas se cubre de filamentos de actina. La cubierta de actina se organiza para formar apéndices de actina F, facilitando el desplazamiento de *L. monocytogenes* en el interior del macrófago y la posterior diseminación a macrófagos contiguos. Las condiciones que existen en el fagolisosoma, pH de 5.5+/-0.2 y bajas

Especialización en Seguridad Alimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP

concentraciones de hierro no le permiten multiplicarse, pero inducen la secreción de Listeriolisina O (LLO). Una vez la LLO perfora la membrana vacuolar, es reconocida por enzimas en el citoplasma de las células y destruida antes de que pueda dañar la membrana celular. La LLO actúa como un estímulo inflamatorio induciendo activación celular endotelial, activación neutrofílica y apoptosis, y es responsable de la b-hemólisis en agar sangre. Existen cepas de *L. monocytogenes* no productoras de Listeriolisina O, pueden sobrevivir dentro de las vacuolas de los fagocitos, pero no se pueden multiplicar e infectar otras células debido a la incapacidad de escapar de las vacuolas (mutantes avirulentas en ratones).

C. Nucleación de filamentos de Actina y expansión célula a célula: Las ATPasa ClpC y ClpE son proteínas de “stress” que ayudan en la disrupción de la membrana vacuolar y la supervivencia intracelular de *Listeria*.

D. Expansión de célula a célula: *L. monocytogenes* sobrevive dentro de fagosomas secundarios de doble membrana en la nueva célula infectada hasta la disrupción de la membrana vacuolar y la reiniciación de un nuevo ciclo de infección.

Numerosas observaciones indican que la virulencia de *L. monocytogenes* varía entre los aislamientos. Distintos grupos de investigadores, observaron que entre un 8 y un 21% de los aislamientos naturales de *L. monocytogenes*, tanto de alimentos como ambientales, tienen atenuada su virulencia o son totalmente avirulentos. La secuenciación del genoma completo de la primera cepa de *L. monocytogenes* y su comparación con el genoma de *L. innocua*, permitió determinar que 10% de los genes son diferentes en la especie patógena respecto de la no patógena.

En la evaluación y control de riesgos de la listeriosis alimentaria se plantea una controversia, esta es que aunque que la contaminación de determinados alimentos sea muy frecuente, la enfermedad se asocia con una pequeña subpoblación de esta especie bacteriana y tiene lugar en una pequeña proporción de los individuos susceptibles. En el caso de los alimentos, la prevalencia de *L. monocytogenes* es del 1 al 10%; sin embargo, la listeriosis sintomática es una enfermedad poco frecuente.

Debido a esta patogenicidad variable de *L. monocytogenes*, la capacidad de identificar rápidamente la especie -sobre todo de las cepas implicadas en los casos de listeriosis- y de evaluar rápidamente su potencial patogénico, es un factor crítico para controlar y prevenir la enfermedad.

En los últimos 20 años, *L. monocytogenes* ha pasado de ser el agente causal de una enfermedad infecciosa de importancia limitada a uno de los microorganismos zoonóticos típicos transmitidos por alimentos y de mayor interés para las autoridades de salud pública y la industria de alimentos. Es importante el conocimiento sobre parasitismo intracelular practicado por esta bacteria, los determinantes moleculares responsables de las principales etapas de su ciclo de vida dentro de la célula hospedadora, la fisiopatología de la listeriosis, manifestaciones clínicas y el tratamiento en las poblaciones de riesgo (Vera A y col. 2013).

Manifestaciones Clínicas

Listeria es un microorganismo patógeno que afecta a más de 50 especies animales incluido el humano, aves, garrapatas, peces y crustáceos. Listeriosis es una enfermedad común al hombre y los animales, con manifestaciones en el sistema nervioso, genital o septicemia. En animales domésticos, principalmente en rumiantes, *Listeria monocytogenes* es un patógeno causante de mastitis y abortos en la última etapa de la gestación. La enfermedad puede manifestar con sintomatología nerviosa, fiebre y decaimiento, y puede llegar a producir la muerte.

En el hombre puede producir infecciones que llegan a ser fatales en individuos susceptibles como mujeres embarazadas, neonatos, inmunocomprometidos, gerontes, personas con trasplantes de órganos, y diabéticos. En adultos sanos, la infección por *L. monocytogenes* cursa usualmente en forma asintomática o en algunos casos produce sintomatología similar a una infección por influenza. La enfermedad en humanos presenta un período de incubación puede ir desde 24 h para la forma gastrointestinal, hasta 6 semanas en la forma invasiva (ANLIS/INEI, 1999). La forma gastrointestinal cursa con fiebre, diarrea, mialgia, fatiga y generalmente está asociada a la ingestión de dosis altas de *L. monocytogenes* por personas sanas las cuales se recuperan totalmente en la mayoría de los casos. La forma invasiva puede incluir la presencia de septicemia, meningitis (o meningoencefalitis) y encefalitis, habitualmente precedida de síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre. El porcentaje de mortalidad por infecciones en el sistema nervioso central es alrededor del 20% pero pueden llegar a elevarse hasta un 40-60% si está asociado con enfermedades inmunosupresoras. El 10% de la población que adquiere meningitis bacteriana, es causada por *L. monocytogenes*. La Listeriosis invasiva es una enfermedad relativamente poco común pero habitualmente grave, con una frecuencia típica de 3 a 8 casos por cada 1.000.000 de personas, y tasas de mortalidad del 20 al 30% de los pacientes hospitalizados.

En mujeres embarazadas, *L. monocytogenes* tiene la capacidad de atravesar la placenta y en algunos casos infectar el feto, produciendo abortos, natimortos, partos prematuros, o nacimiento de infantes vivos con infección sistémica por *L. monocytogenes* (granulomatosis infantiséptica) (Smith y col. 2009; Altekruze y col. 1997; Ciesilski C y col. 1988).

Tratamiento

La terapia recomendada para Listeriosis en cualquiera de los casos consiste en un tratamiento precoz con ampicilina, y en casos más graves cuando se ve afectado el feto, cerebritis o granulomatosis infantiséptica, se hace una combinación con gentamicina. La terapia alternativa para pacientes alérgicos a penicilina consiste en la combinación de trimetoprim y sulfametoxazol (Sánchez Artolaa B, 2010).

Legislación Alimentaria

Se sabe que la dosis infectiva de *L. monocytogenes* es de, al menos, 10^2 células viables en el caso de los grupos de riesgo, y que esta cifra aumenta hasta 10^4 en el caso de la población sana. Sin embargo, aún existen muchas incógnitas sobre la relación dosis-respuesta de la listeriosis humana y del papel que juega la virulencia de la cepa implicada, así como su interacción con el hospedador (McLauchlin J y col. 2004). Por este motivo, en la actualidad se sigue considerando a todos los aislamientos de *L. monocytogenes* igual de patógenos, aunque existen cada vez más estudios que indican que la virulencia varía de una cepa a otra.

La cantidad de *L. monocytogenes* tolerada por gramo de alimento, varía según los países: en EEUU, se tolera 0 en 25 g de muestra, mientras que en algunos países de la Unión Europea, permiten presencia de hasta 100 UFC/g en algunos alimentos (CODEX ALIMENTARIUS 2007, Reglamento CE 1441/2007).

El Código Alimentario Argentino (CAA, 2018), por su parte, exige en quesos de mediana, alta y muy alta humedad ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de muestra, al igual que en queso mozzarella. También indica ausencia en 25 g en comidas LPC (listos para ser consumidos) y en su capítulo de cárneos y afines, ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g para salazones (cocidas y crudas), jamón crudo, pernil de cerdo y chacinados (Código Alimentario Argentino, 2018).

Numerosos investigadores, incluyendo la ICMSF (por sus siglas en inglés *International Commission on Microbiological Specifications for Foods*), proponen un valor límite de inocuidad alimentaria no mayor de 100 UFC/g al momento del consumo (Michanie S, 2004). Debido a esto, es de suma importancia contar con métodos adecuados de identificación y tipificación de *L. monocytogenes*, ya que pueden ser de utilidad en las investigaciones

Especialización en Seguridad Alimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP

epidemiológicas, en el seguimiento de contaminaciones medioambientales y en la vigilancia en salud pública.

Diagnóstico Microbiológico

Los métodos convencionales para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos que ganaron aceptación con propósitos reglamentarios internacionales son el método propuesto por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), la Norma ISO 11290-1:2004 (ISO, 2004) y modificaciones ISO 11290-1:2017 (2017), el método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los métodos internacionales validados por organismos como la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC, 1984) y Estándares franceses (AFNOR, 2000), entre otros. El ANMAT en su publicación “ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS” Metodología Analítica Oficial (2011) propone realizar el análisis microbiológico según la norma “International Standard ISO 11290-1:2004” y una vez identificado el microorganismo como *Listeria monocytogenes* por propiedades bioquímicas y morfológicas, la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización.

Prevención en plantas productoras de alimentos.

Sistema de Gestión de Inocuidad en planta productoras de alimentos.

Los diferentes actores de la cadena alimentaria desde la producción primaria hasta la comercialización, son los responsables de ofrecer al consumidor un alimento inocuo. El programa de HACCP en la actualidad, es la mejor herramienta para el logro de la inocuidad alimentaria. Este sistema es un método caracterizado por presentar enfoques preventivos y sistemáticos, para eliminar o minimizar los peligros físicos, químicos y biológicos en los alimentos. Su carácter prospectivo, lo convierte en una herramienta fundamental para la inocuidad de los alimentos, aplicable a lo largo de toda la cadena agroalimentaria desde la producción primaria hasta el consumidor (Organización Mundial de la Salud, 2016).

El análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP)

Al ser un sistema preventivo, el HACCP logra muchas veces anticiparse a los problemas evitando que lleguen a concretarse, lo que modifica sustancialmente el tradicional enfoque de la inspección y el control del producto final, que ante la aparición de un problema, sólo genera

Especialización en Seguridad Alimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP

acciones tardías, costosas y generalmente poco efectivas para proteger la salud de los consumidores. Además de propender a la inocuidad de los alimentos, la aplicación del Sistema HACCP, brinda beneficios adicionales muy importantes, como optimizar el uso de los recursos económicos de la industria alimentaria, reduciendo las pérdidas por los rechazos debidos a la falta de inocuidad, etc. Ciertamente, la implementación de este Sistema también contribuye a promover el comercio internacional de alimentos al mejorar la confianza de los compradores. Si bien el sistema HACCP tiene ventajas como las mencionadas, exige un real compromiso de la dirección de la empresa y de todo el personal, para lograr una inserción sólida y eficaz, y con la dinámica necesaria para ajustarse a los cambios que puedan surgir (Pennimpe M y col. 2003, FAO 2016).

Prerrequisitos, las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM) y los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES).

Además del compromiso de directivos y empleados en el desarrollo del HACCP, resulta imprescindible que previamente a su implementación, se cumpla con los prerrequisitos (ISO 22000. 2005), como son las Buenas Prácticas de Manipulación (BPM) y los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES), que ya son obligatorios en los establecimientos habilitados conforme lo establecido en el Capítulo XXXI del Reglamento de Inspección de Productos, Subproductos y Derivados de Origen Animal (Decreto N°4238/68).

Los POES son procedimientos operativos estandarizados que describen las tareas de saneamiento. Se aplican antes, durante y después de las operaciones de elaboración. Se encuentra en vigencia la Resolución N° 233/98 de SENASA que legitima la obligatoriedad en todos los establecimientos donde se faenen animales, elaboren, fraccionen y/o depositen alimentos (POES, 2018).

Cada POES debe estar firmado por una persona de la empresa con total autoridad en la planta. Las prácticas y procedimientos de saneamiento escritos se deben desarrollar e implementar para prevenir la contaminación (directa o cruzada) o la adulteración de los alimentos que allí se producen, elaboran, fraccionan y/o comercializan (SENASA 2016). Si el establecimiento o la autoridad sanitaria detectaran que el POES falló en la prevención de la contaminación o adulteración del producto, se deben implementar medidas correctivas. Estas incluirán la correcta disposición del producto afectado, la reinstauración de las condiciones sanitarias adecuadas y la toma de medidas para prevenir su recurrencia.

El establecimiento debe llevar además, registros diarios suficientes para documentar la implementación y el monitoreo de los POES y de toda acción correctiva tomada. Estos registros deben estar disponibles cuando la Autoridad Sanitaria así lo solicite.

Requisitos POES

- ✓ Cada establecimiento debe contar con su propio “Manual de POES” donde se describen todos los procedimientos de limpieza y desinfección que se realizan periódicamente antes y durante las operaciones que sean suficientes para prevenir la contaminación o adulteración de los alimentos que allí se manipulan.
- ✓ Una vez desarrollado, cada POES será firmado y fechado por un empleado responsable/ supervisor con autoridad superior. Esta firma significa que el establecimiento implementará los POES tal cual han sido escritos y, en caso de ser necesario, revisará los POES de acuerdo a los requerimientos normativos para mantener la inocuidad de los alimentos que allí se manipulan.
- ✓ Los POES deben identificar procedimientos de saneamiento pre operacionales y deben diferenciar las actividades de saneamiento que se realizarán durante las operaciones.
- ✓ Los POES pre operacionales serán identificados como tales, realizados previo al inicio de las actividades/operaciones e indicarán como mínimo los procedimientos de limpieza de las superficies e instalaciones en contacto con los alimentos, equipamiento y utensilios.
- ✓ En el saneamiento operacional (Se refieren a aquellas prácticas de limpieza y desinfección que son llevadas a cabo durante las operaciones de producción) se deberán describir los procedimientos sanitarios diarios que el establecimiento realizará durante las operaciones para prevenir la contaminación directa e indirecta de productos o su alteración. Los procedimientos establecidos durante el proceso deberán incluir:
 - La limpieza y desinfección de equipos y utensilios durante los intervalos en la producción.
 - Higiene del personal: hace referencia a la higiene de las prendas de vestir externas y guantes, cobertores de cabello, lavado de manos, estado de salud, etc.
 - Manejo de los agentes de limpieza y desinfección en áreas de elaboración de productos. Los establecimientos con procesamientos complejos, necesitan

procedimientos sanitarios adicionales para asegurar un ambiente apto y prevenir la contaminación cruzada.

- Estos procedimientos deben ser monitoreados, verificada su eficacia y en caso de considerarse necesario, revisados con cierta frecuencia.
- Los POES son desarrollados para todas las operaciones y todos los turnos de actividad.
- Resulta esencial el entrenamiento de los empleados para la aplicación de POES y el énfasis en la importancia de seguir las instrucciones de cada procedimiento para lograr la inocuidad de los productos (POES 2018, Quintela y col. 2013).

Ejemplo de construcción de un manual de POES para un establecimiento productor de alimentos: puntos más importantes

- ✓ Caratula de comienzo: Nombre y ubicación de la planta procesadora, quien lo elaboró, la última revisión. Nombre y firma de las autoridades.
- ✓ Listado de Documentos: Nombre y contenido de cada documento con su respectiva identificación (Ej. Uso de un código interno) y su vigencia.
- ✓ Registro histórico de acciones correctivas que fueron aplicadas.
- ✓ Construcción de un plan de verificación, evaluación y conclusiones. Registros. Informe final y las modificaciones a llevar a cabo.
- ✓ Procedimientos de Limpieza y Desinfección pre-operacional y operacional en todas las etapas de producción. Construcción de diagramas de flujo. Descripción detallada de la metodología de sanitización a utilizar. Responsable, frecuencia y alcance.
- ✓ Descripción de los insumos destinados a limpieza, habilitaciones, forma de uso, responsable de la preparación, etc.

Ejemplo de construcción del Documento:

Título: PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE CAMARAS FRIAS.

Construcción del flujograma de la operatoria de limpieza y desinfección

Recolección de sólidos
Prelavado
Aplicación del detergente/espuma
Acción mecánica (restregado)
Enjuague
Escurreo y secado
Inspección-----No conforme-----Repetir
Conformidad
Desinfección
Verificación
Acción correctiva
Registro

Descripción detallada del procedimiento:

- Responsable:
- Frecuencia:
- Alcance:
- Operatoria: Descripción paso por paso. Aplicado a superficies (paredes, puertas, rieles, pisos, equipos, etc.) cada una de ellas puede tener una operatoria diferente.
- Verificación y corrección de desviaciones:
 En esta etapa, el responsable del monitoreo realiza tareas de verificación periódica del control, para validar el proceso de limpieza y desinfección. La verificación deberá quedar registrada en la columna correspondiente de las planillas de control. Los métodos que pueden ser utilizados para evaluar la limpieza son (ANMAT 2013, 2014):
 - No microbiológicos:
 - Comprobación sensorial diaria (visual, tacto, olfato).
 - ATP Bioluminiscencia (detección de ATP).
 - Detección de proteínas.

Microbiológicos:

- Indirectas: – Hisopado. – Esponjado.
- Directas: – Petrifilm.
- Acciones correctivas: se aplicarán si se observaran modificaciones en los parámetros asignados a la planta.
- Registros.

En suma: para cada superficie que entre en contacto con los alimentos, la empresa debe demostrar efectividad del protocolo de sanitización utilizado, frecuencia de aplicación y la capacitación del operario responsable, verificación y acciones correctivas si las hubiere. Se deben archivar todos los registros que indiquen el historial de la operatoria.

Cuando los POES no son efectivos se observan desvíos, estos demuestran que de alguna manera, ha variado la operativa o no ha sido aplicada correctamente. Al sonar esta alarma, es necesario aplicar acciones correctivas, para solucionar esos desvíos. Si esto no sucede, el flujo de producción se puede convertir un proceso riesgoso para el consumidor.

Si estos desvíos no son detectados a tiempo, pueden dar lugar a la permanencia de residuos orgánicos donde los microorganismos pueden adaptarse, producir biopelículas, y como resultado final originar la contaminación del producto. En este caso, *L. monocytogenes* posee todas las características que lo ubican como uno de los microorganismos patógenos más importantes para producir este tipo de contaminación (Pennimpede y col. 2003, FAO 2016).

Título de la propuesta de trabajo:

Estudio microbiológico de *Listeria monocytogenes* en cámaras de maduración. Evaluación del protocolo de Sanitización vigente.

Objetivo del trabajo:

El objetivo de este trabajo es llevar a cabo un estudio microbiológico para la detección de *Listeria monocytogenes* en cámaras de maduración, con la finalidad de evaluar la efectividad del protocolo de limpieza y desinfección vigente.

Materiales y Métodos:

Toma de muestra: para la obtención de las muestras, los hisopados se realizaron frotando la superficie de estudio, unas 10 veces en forma vertical y otras 10 veces en forma horizontal con

la condición de girar el hisopo a 90°. Los hisopos utilizados fueron de marca Britania (167KS01 Plástico Rayón). Se depositaron en 10 ml de caldo Half Fraser (Oxoid SR0166), manteniéndolos a una temperatura de 4°C. Se resolvió que la toma de muestra se llevara a cabo en 4 superficies diferentes:

Superficies hisopadas:

- Marco de puerta de ingreso a cámara de maduración, 100 cm²
- Baranda protectora de pared en cámara, 100 cm²
- Rendijas de equipo de circulación de aire, 100 cm²
- Rejilla de drenaje en cámara de maduración, toda la parte superior y bordes 100 cm²

Número de muestras: Las muestras remitidas en total fueron 64, las mismas se obtuvieron de 16 cámaras frías pertenecientes a 8 establecimientos frigoríficos. El estudio microbiológico se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos FCV-UNLP.

Análisis microbiológico: se utilizó la metodología descrita por la International Standard (ISO), para la detección de *Listeria monocytogenes* (11290-1: 2004). Es una norma horizontal que puede utilizarse para la detección de *Listeria* spp y *L. monocytogenes* en una gran variedad de alimentos y productos alimenticios (Figura 1).

En resumen: los hisopos se depositaron en tubos con 10 ml de enriquecimiento “primario” o pre-enriquecimiento con “caldo *half* Fraser” (caldo Fraser a la mitad de la concentración) y se incubó 24 h a 30°C. Seguido se inocularon 0,1 ml de cultivo en 10 ml de caldo Fraser (para el enriquecimiento “secundario” con agentes selectivos a la concentración normal). Una vez terminada la incubación, se sembró en superficie sobre los medios (agares selectivos y diferenciales para *L. monocytogenes* agar *Listeria* de acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) y PALCAM (Acumedia Lab.). Seguido, las colonias que mostraron características fenotípicas similares a las de *Listeria* fueron repicadas al medio sólido tripticasa de soya (Acumedia Lab.) para su posterior identificación (Foto 1).

Figura 1: Flujoograma detección de *Listeria monocytogenes* ISO 11290-1: 2004.

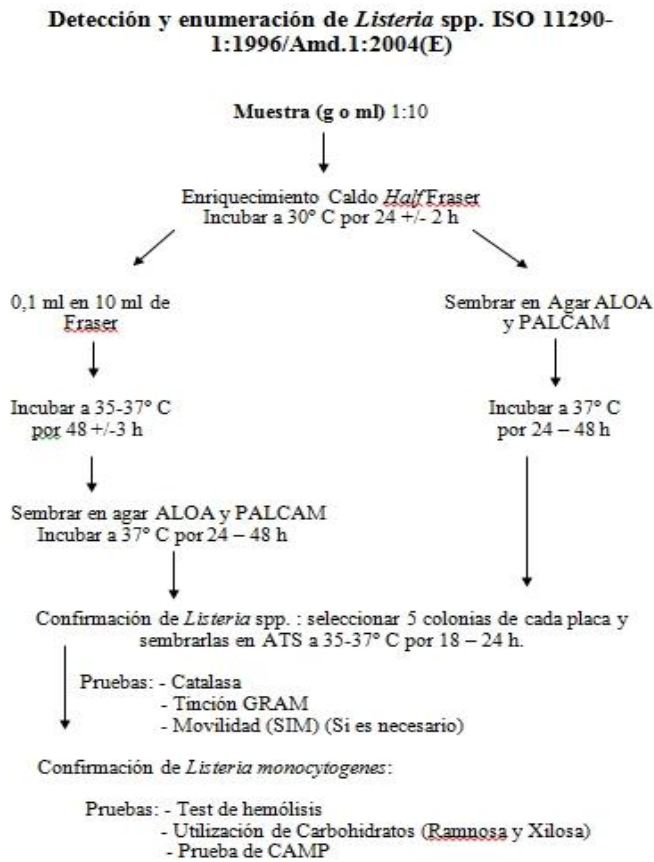
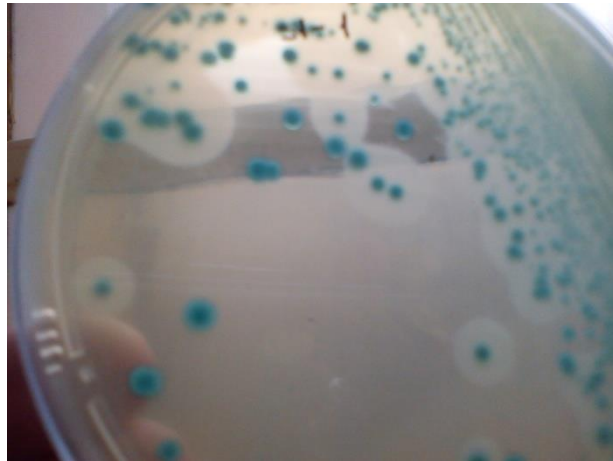


Foto 1. Colonias de *Listeria* spp que desarrollaron en medio sólido ALOA



Para la identificación de *Listeria* spp. se realizaron las siguientes pruebas: catalasa, Coloración de Gram, Prueba de la movilidad, Test de hemólisis, Utilización de carbohidratos (ramnosa y xilosa) (Tabla 1), Prueba de CAMP (Christie- Atkins- Munch-Peterson) (Foto 2).

Pruebas realizadas:

-Prueba de la catalasa: se picó una colonia aislada y se resuspendió en una gota de solución de peróxido de hidrógeno en la superficies de un portaobjeto. La reacción positiva se observó con la presencia de burbujas de gas.

-Coloración de Gram: se picó una colonia aislada, se procedió a la coloración y se observó la presencia de bacilos Gram positivos cortos y delgados.

-Prueba de la movilidad: se picó una colonia aislada y se inoculó en profundidad (con una aguja de inoculación) en un agar movilidad, incubándose 48 h a 25°C. Se consideró positivo cuando la cepa desarrolló un crecimiento en forma de paraguas, característica propia de las cepas de *Listeria* spp.

Para confirmar los cepas aisladas como *Listeria* spp. se realizaron los siguientes ensayos:

-Test de hemólisis: Cada colonia aislada se sembró en agar sangre de oveja con un control positivo (*L. monocytogenes*) y un control negativo (*L. innocua*). Luego de la incubación, se evaluó si la cepa producía una delgada y clara zona de β – hemólisis.

-Utilización de carbohidratos (ramnosa y xilosa): Se inocularon los dos caldos con azúcares, a partir de las 48 horas se consideró reacción positiva (formación de ácido) cuando el medio con el azúcar se tornó de color amarillo.

-Prueba de CAMP (Foto 2): Se inocularon las cepas aisladas, las cepas de referencia *S. aureus* ATCC 25923 ó ATCC 4944, *Rhodococcus equi* ATCC 6939, y cepas control de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*. Después de incubar 18 h a 24 h a 35°C, se consideró una reacción positiva para *L. monocytogenes*, a una zona acrecentada de β -hemólisis en la intersección de los cultivos aislados con la cepa de *S. aureus*.

Foto 2: Test de CAMP

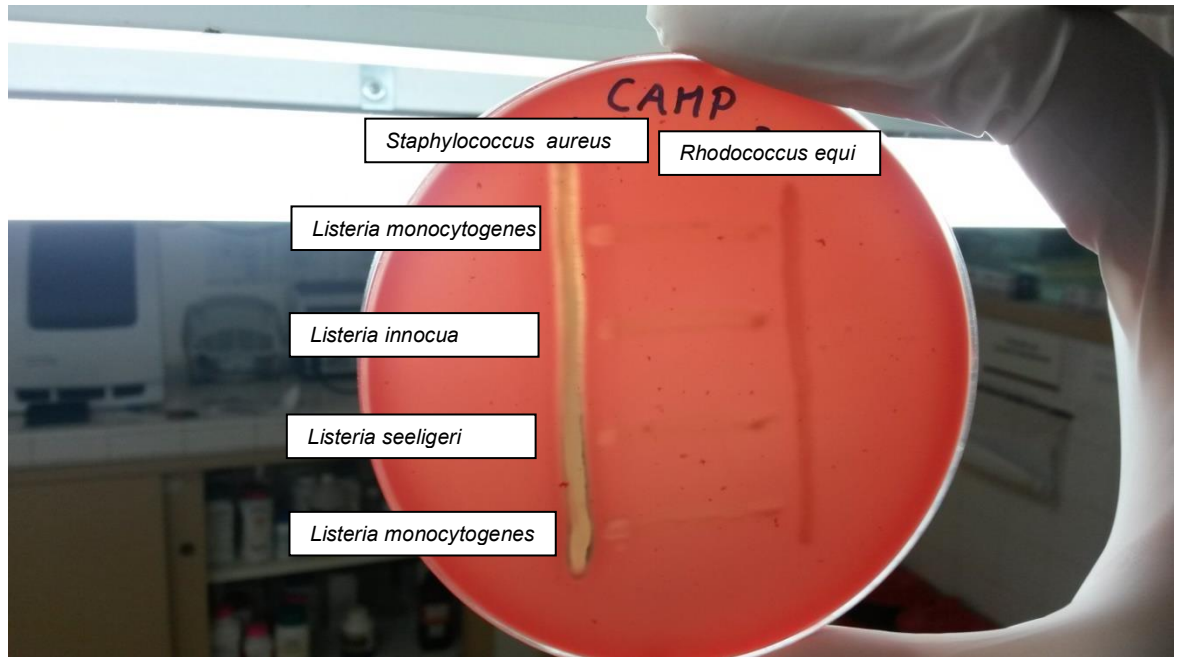


Tabla 1. Caracterización de *Listeria* spp. ISO 11290-1: 2004

ESPECIE	HEMÓLISIS	PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS		TESTE DE CAMP	
		Ramnosa	Xylosa	<i>S. auerus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i> suesp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> subesp. <i>Murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: reacción variable; (+) reacción débil; + > 90% reacciones positivas; - ninguna reacción

Estudio de las cepas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT):

Extracción de ADN: Las cepas aisladas se inocularon en caldo Cerebro Corazón (Acumedia Lab.) y se incubaron a 30°C durante 18 horas. Seguido se utilizó el ensayo foodproof® ShortPrep II (Bioteccon Diagnostics, Alemania) para bacterias gram positivas, cumpliendo los siguientes pasos:

- El cultivo se agito durante 1 minuto, luego se dejó en reposo por 10 minutos.
- Se transfirieron 200 microlitros al tubo de reacción con el reactivo ready-to-use foodproof ShortPrep II Lysis.
- Se mezcló suavemente invirtiendo el tubo. Seguido, se centrifugó a 8000 x g.

- Se descartó el sobrenadante y se adhirió 200 microlitros de reactivo de resuspensión foodproof ShortPrep II. Se colocó el tubo para la destrucción celular durante 8 minutos.
- Luego se incubó durante 5 minutos a 95°C, se dejó enfriar y luego se mezcló con vortex.
- El sobrenadante con ADN, fue usado para la técnica de PCR

Las cepas fueron analizadas por PCR-RT, con el ensayo foodproof *Listeria monocytogenes* Detection Kit-5 (Biotecon Diagnostics) identifica todos los serotipos de *L. monocytogenes*. Tanto la detección de ADN y PCR se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se para este estudio se utilizó un equipo

Tipificación de cepas aisladas: Se dará cumplimiento a los indicado por el ANMAT en su publicación “ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE LOS ALIMENTOS” METODOLOGÍA ANALÍTICA OFICIAL (2011), donde expresa que una vez identificado el microorganismo como *Listeria monocytogenes* por propiedades bioquímicas y morfológicas, la cepa debe ser enviada al Centro de Referencia Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas A.N.L.I.S “Dr. Carlos G. Malbrán”, para una mayor caracterización. Cada cepa aislada se inoculó en punción en medio semisólido (Britania), se incubaron durante 18 horas y se enviaron con una protección de dos envases secundarios.

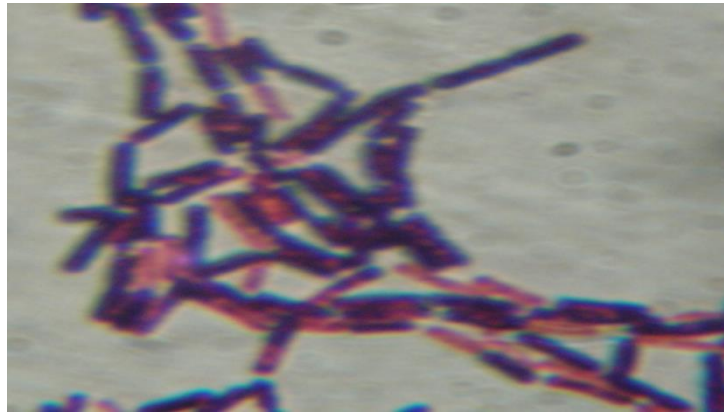
Resultados y discusión:

Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

Medios de cultivo sólidos: En los medios Palcam y Aloa, se observaron colonias compatibles con *Listeria* spp. las que fueron aisladas para realizar la coloración y las pruebas bioquímicas recomendadas por la norma ISO 11290-1: 2004.

Coloración de Gram: Se observaron bacilos Gram positivos (Foto 3)

Foto 3: Coloración de Gram



Pruebas bioquímicas según la norma ISO 11290-1: 2004 (Tabla 2)

Tabla 2: Identificación bioquímica de las cepas aisladas.

Cepa	hemólisis	producción de ácidos		teste de Camp	
		Ramnosa	Xylosa	<i>S. auerus</i>	<i>R. equi</i>
2B	+	+	-	+	-
2B1	+	+	-	+	-
3C	+	+	-	+	-
3C1	+	+	-	+	-
4C	+	+	-	+	-
4C1	+	+	-	+	-
4E	+	+	-	+	-
4E1	+	+	-	+	-
8E	+	+	-	+	-
4ª	-	-	-	-	-

Como se observa en la Tabla 2, 9 cepas se comportaron biológicamente como *L. monocytogenes*. La cepa restante (denominada 4) mostró características compatibles con *Listeria* spp.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR-RT): De las 10 cepas analizadas por PCR en tiempo real, 9 fueron confirmadas como *Listeria monocytogenes* (2B, 2B1, 3C, 3C1, 4C, 4C1, 4E, 4E1y 8E) y 1 como *Listeria* spp. (4A).

Los lugares donde se aislaron las cepas de *Listeria monocytogenes* y *L. spp* fueron:

Lugar	Cepa aislada	Numero de cepas
Marcos de puertas de ingreso a cámara de maduración	<i>L. monocytogenes</i>	3
Rendijas de equipo de circulación de aire	<i>L. monocytogenes</i>	1
Barandas protectoras de pared en cámara	<i>L. monocytogenes</i>	3
Rejillas de drenaje en cámaras de maduración	<i>L. monocytogenes</i>	1
Rejillas de drenaje en cámaras de maduración	<i>L. monocytogenes</i> y <i>L. spp</i>	1

Las propiedades intrínsecas que posee *Listeria spp* facilitan que el medio ambiente donde se encuentran, no sea un verdadero problema para su desarrollo (Copes y col. 2002). Las bajas temperaturas y la alta humedad presente en las cámaras frigoríficas, son un ámbito muy favorable para que se produzca la adhesión irreversible, colonización y formación de biofilms (Mesa Ramírez L 2016, Peña S 2010). Se ha determinado que *L. monocytogenes* ingresa en los distintos lugares de proceso a través de la vestimenta, el calzado, las manos de los operarios, como también con los utensilios y equipamiento (Jeong y col, 1994). Cuando estos entran en contacto con el producto u otras superficies, se produce contaminación cruzada (SENASA 2016).

La presencia de *L. monocytogenes* en materias primas, o la contaminación en las distintas etapas de proceso es otra de las vías de penetración en lugares que deben estar libres de estos peligros (SENASA 2016).

Lo expuesto anteriormente, refuerza la necesidad que las industrias procesadoras establezcan barreras que minimicen su ingreso a los lugares de proceso y conservación. La aplicación de sistemas de Gestión de Inocuidad, tales como el HACCP y los pre-requisitos, son las herramientas necesarias para lograr controlar los peligros en todas las etapas de la producción y conservación (FAO-OMS 2015).

En este trabajo, se aislaron 9 cepas de *Listeria monocytogenes* las cuales son consideradas como bacterias patógenas, y de ese modo no deben estar presentes en las superficies internas de las cámaras frigoríficas. Esta situación demuestra que el equipo

responsable de estos lugares, tendrían que revisar profundamente el sistema de gestión de inocuidad, y en especial hacer incapié en un objetivo general, y en varios particular.

Objetivo general: diagramar, modificar o modernizar una metodología de capacitación tanto a formadores como a operarios.

Objetivos en Particular:

- Personal: Implementar un riguroso control del uniforme, lavado de manos, uso de pediluvios y redistribución del tránsito de personas que ingresan al lugar donde se procesan y conservan los alimentos (FAO-OMS 2016).
- Limpieza y desinfección de cámaras: Dada la dificultad para impedir su ingreso a los lugares de procesamiento, es necesario tomar medidas rigurosas para su eliminación durante los procesos de limpieza e higienización y conocer los parámetros que limitan su desarrollo (Schöbitz R 2009, SENASA 1 2016). Uno de los problemas que enfrenta la industria es que los productos químicos utilizados para higienizar superficies como el ácido peracético, amonios cuaternarios y compuestos clorados no garantizan la eliminación del patógeno o bien pierden su efectividad en presencia de materia orgánica, como es el caso del cloro (Schöbitz, R. 2009). Debemos tener en cuenta que los biofilms formados en superficies donde han quedado residuos orgánicos dificultan la acción de los higienizantes (Lundén J y col. 2004, Peña S 2010), por lo que es de suma importancia cumplir meticulosamente con todas las etapas del protocolo de limpieza y desinfección implementado la empresa. En el caso de que el sistema vigente de sanitización no arroje resultados dentro de los parámetros establecidos, se dispondrán las modificaciones necesarias para obtener los parámetros que garanticen la inocuidad (Ríos Castillo A, 2013).
- Utensilios y productos de limpieza: Realizar una exhaustiva inspección para verificar los siguientes puntos:
 - El correcto estado de todos los utensilios que se emplean en la limpieza y desinfección.
 - Verificar los productos químicos de limpieza (Detergente/Desengrasante): Conservación, dosis utilizada, forma de dilución y aplicación.
 - Verificar los productos químicos para la desinfección (Desinfectantes): Conservación, dosis utilizada, forma de dilución y aplicación.

- Reunión con el personal encargado del POES: Verificar si la operatoria se cumple.

Si se observan no conformidades en cualquier ítem, proceder con las medidas correctivas necesarias para obtener una operatoria efectiva (SENASA 1 2016).

- Monitoreo: Rediseñar el monitoreo. Implementar la metodología de detección de *L. monocytogenes*. Según los resultados microbiológicos obtenidos, implementar la frecuencia de los análisis.

Conclusión:

Tomando como punto de partida el objetivo de este trabajo, se concluye que el sistema de sanitización que se aplica en 4 de las 16 cámaras estudiadas, no es efectivo para mantener los parámetros microbiológicos requeridos con respecto al patógeno investigado.

Bibliografía

- Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud (1999) Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. ANLIS/INEI Dr. Carlos G. Malbrán. Departamento de Bacteriología, Servicio de Bacteriología Especial. Detección de *Listeria monocytogenes*. Vigilancia de Listeriosis.
- AFNOR Association française de Normalisation (2000). Validation of the ALOA method for the detection of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs. Colloque de la Société Française de Microbiologie, Paris 19-20.
- Altekruze S, Cohen M, Swerdlow D. (1997) Emerging Foodborne Diseases. *Emerging Infectious Diseases* 3: 285-293.
- ANMAT (2013) Manual de análisis microbiológico de los alimentos – microorganismos patógenos - volumen II. Ministerio de Salud. 2013. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Comunicado_Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_II.pdf
- ANMAT (2014) Microorganismos indicadores volumen 2. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_III.pdf
- AOAC (Association of official analytical chemists) (1984). Official Methods of Analysis. Fourteenth Edition

- Aureli P, Fiorucci GC, Caroli D, Marchiaro G, Novara O, Leone L and Salmaso S (2000). An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New England Journal of Medicine* 342: 1236–1241.
- *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (1986). Volume 2. Baltimore: Williams and Wilkins
- Beuchat L, Ryu J (1997). Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases* 3: 459–465.
- CDC (center for Disaster Control and Prevention) (2008). Summary of Notifiable Diseases in the United States 2008. <https://www.cdc.gov/MMWR/preview/mmwrhtml/mm5754a1.htm>.
- Ciesilski C, Hightower A, Parsons S, Broome C, (1988) Listeriosis in the United States: 1980-1982. *Archives of Internal Medicine* 148: 1416-1419.
- CODEX ALIMENTARIUS (2007) Directrices sobre la aplicación de principios generales de higiene de los alimentos para el control de *Listeria monocytogenes* en los alimentos CAC/GL 61.
- Código Alimentario Argentino (CAA) (2018). Ley 18284. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp
- Copes J, Pellicer K, Echeverria G, Stanchi N, Martinez C, Leardini, N. (2000). Investigación de *Listeria monocytogenes* en quesos de pasta blanda. *Revista Argentina de Microbiología* 32: 49-52.
- Copes J, Pellicer K, Malvestiti L, Stanchi N. (2002). Sobrevivencia en tablas de cocina de Madera y plástico inoculadas experimentalmente con *Listeria monocytogenes*. *Analecta Veterinaria* 20: 47-50.
- Czuprynski C, (2005) *Listeria monocytogenes*: silage, sandwiches and science *Animal Health Research Reviews* Volume 6, Issue 2, pp. 211-217
- DECRETO 4238/68. SENASA (2015). Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/decreto-423868>
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013). EFSA Reports on *Listeria* levels in certain ready-to-eat-foods 2013. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/130627>
- FAO (2004). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo: resumen interpretativo. FAO Roma 2004, impreso. Disponible en: <http://catalogosuba.sisbi.uba.ar/vufind/Record/http%253A%252F%252Fwww.agro.uba.ar%252Fusers%252Ffrins%252Fagromono%252F012086>

- FAO. CÓDIGO INTERNACIONAL RECOMENDADO DE PRÁCTICAS - PRINCIPIOS GENERALES DE HIGIENE DE LOS ALIMENTOS. 2016. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/005/y1579s/y1579s02.htm#bm2.7.2>
- FAO-OMS (2015) Justificación e importancia del Sistema HACCP. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10834%3A2015-justificacion-e-importancia-del-sistema-haccp&catid=7887%3Ahaccp-contenidos&lang=es
- FAO-OMS (2016) Higiene del Personal. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10823%3A2015-higiene-personal&catid=7677%3AAbpabpm&Itemid=42210&lang=es
- Hmaied F, Helel S, Le Berre V, Francois J, Leclercq A, Lecuit M, Smaoui H, Kechrid A, Boudabous A, Barkallah I, (2014) Prevalence, identification by a DNA microarray-based assay of human and food isolates *Listeria* spp. from Tunisia. *Pathol Biol (Paris)* 62:24–29. doi: 10.1016/j.
- Huang Y, Ko WC, Chan Y, Lu J, Tsai H, Liao C, Sheng W, Teng L, Hsueh P, (2013). Disease burden of invasive listeriosis and molecular characterization of clinical isolates in Taiwan. *PLoS One*. 2015;10:e0141241. doi: 10.1371/journal.
- ILSI Research Foundation; Risk Science Institute. (2005). Achieving continuous improvement in reduction of foodborne listeriosis-a risk-based approach. *Journal of Food Protection* 68 (9): 1932-94.
- ISO 11290-1:2004 (2004) Detección y Enumeración de *Listeria* *Listeria* spp. Disponible en: <https://www.iso.org/standard/60313.html>
- ISO 11290-1:2017 (2017) Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. — Part 1: Detection method. Disponible en: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:11290:-1:ed-2:v1:en>
- Iso 22000 (2005) Sistemas de gestión de la inocuidad de los alimentos – Requisitos para cualquier organización en la cadena alimentaria. Disponible en: http://marcelrzmur.com.mx/SistemasCalidadAlimentos/iso22000_2005.pdf
- Jay J, (2000). *Modern Food Microbiology*, sixth ed. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD, p 679.
- Jeong D, Frank J (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* at 10°C in Biofilms with Microorganisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments. Department

- of Food Science and Technology; University of Georgia, Athens, Georgia. Disponible en: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-57.7.576?code=fopr-site>
- Kalmokoff M, Austin J, Wan X, Sanders G, Benerjee s, Farber J, (2001) Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions. *Journal of Applied Microbiology* 91, 725-734.
 - Koch J, Dworak R, Prager R, Becker B, Brockmann S, Wicke A, Wichmann-Schauer H, Hof H, Werber D, Stark K. (2010). Large Listeriosis Outbreak Linked to Cheese Made from Pasteurized Milk, Germany 2006-2007. *Foodborne Pathogens and Disease*. Vol. 7, N° 12: 1581-1584.
 - Kumar G, Anand S. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, pp: 9 27.
 - Lovett J. (1988). Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *Journal of Association of Official Analytical Chemists* 71: 658-660.
 - Lundén J, Tolvanen R, Korkeala H, (2004) Human Listeriosis Outbreaks Linked to Dairy Products in Europe. *Journal of Dairy Science* Vol 87, Supplement, Pages E6–E12. Disponible en: [http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(04\)70056-9/abstract](http://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(04)70056-9/abstract)
 - McLaughlin J, Mitchell R, Smerdon W, Jewell K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J Food Microbiol* 92, 15–33.
 - Mengoni G, Apraiz P, (2003). Monitoreo de un plan HACCP para el control de *Listeria monocytogenes*. *Revista Argentina de Microbiología* 35 (4): 224-227.
 - Mesa Ramirez, L (2016) Estrategias para minimizar los riesgos asociados a *Listeria monocytogenes* en el procesamiento de leche pasteurizada. Monografía para optar al título de Especialista en Procesos de Alimentos y Biomateriales. Universidad nacional abierta y a distancia – UNAD Escuela de ciencias básicas, ingeniería y tecnología. Especialización en ingeniería de procesos de alimentos y biomateriales. Bogotá. <http://stadium.unad.edu.co/preview/UNAD.php?url=/bitstream/10596/11186/1/52905254.pdf>
 - Michanie S. (2004). *Listeria monocytogenes*: la bacteria emergente de los '80. Recuperado de <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=AR2004000100>.
 - Noriega E (2010) Seguridad alimentaria modelización y control del desarrollo de *Listeria* en sistemas estructurados. Tesis. Universidad de Oviedo (España) <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=113181>
Especialización en Seguridad Alimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP

- Organización Mundial de la Salud (OMS). Inocuidad de alimentos. 2016. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/es/>
- Orihuel Iranzo E, Bertó Navarro R, Canet Gascó J, Cartón F, (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
- Orsi H, Wiedmann M. (2016). Characteristics and distribution of Listeria spp., including Listeria species newly described since 2009. Applied microbiology Biotechnology 100:5273-5287.
- Pan Y, Breidt F, Kathariou S, (2006) Resistance of Listeria monocytogenes Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. Applied and Environmental Microbiology. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/72/12/7711.abstract>
- Pellicer K, Copes J, Giannuzzi L y Zaritzky N. (2011). Behavior of Listeria monocytogenes type 1 355/98 (85) in meat emulsions as affected by temperature, pH, water activity, fat and microbial preservatives. Food Control 22: 1573-1581.
- Pellicer K, Copes J, Malvestiti L, Lanfranchi M, Stanchi N, Echeverria G y Nosetto E. (2002). Aislamiento e Identificación de Listeria monocytogenes y Listeria spp. en embutidos secos obtenidos en mercados de la ciudad de La Plata, Argentina. Revista Argentina de Microbiología 34: 219-221.
- Pennimpe M. Guía Orientadora para la Implementación del HACCP. Circular 3579. 2003. Disponible en: <http://www.saludneuquen.gob.ar/wp-content/uploads/2014/06/Gu%C3%ADa-Orientadora-SENASA-HACCP.pdf>
- Peña S, (2010) Los Biofilms y su repercusión en la Industria Alimentaria. Disponible en: <https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>
- Perrin M, Bemer M, Delamare C, (2003). Fatal case of Listeria innocua bacteriemia. Journal of Clinical Microbiology 41: 5308-5309.
- PROCEDIMIENTOS OPERATIVOS ESTANDARIZADOS DE SANEAMIENTO (POES) (2018) Programa Calidad de los Alimentos Argentinos. Dirección de Promoción de la Calidad Alimentaria – SAGPyA. Disponible en: http://www.conal.gob.ar/Notas/Recomenda/Boletin_POES.PDF
- Quintela A, Paroli C (2013). Guía práctica para la aplicación de los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento. Servicio de Regulación Alimentaria.

- Montevideo. Uruguay. Disponible en:
http://www.montevideo.gub.uy/sites/default/files/poes1_05apr2013_cierre_11.pdf
- Ramage C, Low J, McLauchlin J, Donachie W (1999). Characterisation of *Listeria ivanovii* isolates from the UK using pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett.* 170:349–353. doi: 10.1111/j.1574-6968.
 - Reglamento (CE) N° 1441/2007 Criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Recuperado de: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:ES:PDF>
 - Ríos Castillo A (2013) Evaluación del nivel de contaminación de superficies y la eficacia de productos desinfectantes a corto y largo plazo. Nuevos Métodos. Tesis Doctoral. Disponible en:
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/129381/agrc1de1.pdf;jessionid=88FAC5C016A171D088C665090D04CE8B.tdx1?sequence=1>
 - Sánchez Artolaa B, Palencia Herrejón E (2010) Infecciones por *Listeria*. http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Listerias_Medicine2010.pdf
 - Sauders B, Overdevest J, Fortes E, Windham K, Schukken Y, Lembo A, Wiedmann M. (2012) Diversity of *Listeria* species in urban and natural environments. *Appl Environ Microbiol.* 78:4420–4433. doi: 10.1128/AEM.00282-12.
 - Sayers A, Whitt D, (2005). *Revenge of the Microbes: How Bacterial Resistance is undermining the Antibiotic Miracle.* ASM Press, Washington DC.
 - Schöbitz R, Luigi Ciampi L, Nahuelquin Y, (2009) Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Instituto de Producción y Sanidad Vegetal, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. AGRO SUR 37 (1) 1-8. Disponible en:
<http://mingaonline.uach.cl/pdf/agrosur/v37n1/art01.pdf>
 - Seeliger H, Jones D (1986). Genus *Listeria*. En: P.H.A. Sneath, (ed), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* vol 2. The Williams and Wilkins, Baltimore. MD.
 - SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Animal). *La Contaminación Cruzada.* 2016. Disponible en: <https://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=890&io=4185>
 - SENASA 1 (2016) Manual de procedimientos de desinfección. <https://viejaweb.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=920&io=3948>
 - Smith B, Kemp M, Ethelberg S, Schiellemp P, Bruun B, Gerner-Smidt P, Christensen J, (2009). *Listeria monocytogenes: Maternal-faetal infections in Denmark 1994-2005.* *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 41: 21-25.
Especialización en Seguridad Alimentaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNLP

- Vera A, González G, Domínguez M, Bello H, (2013) Principales factores de virulencia de Listeria monocytogenes y su regulación. Rev. chil. infectol. vol.30 no.4 Santiago de Chile. https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000400010