

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**Listeria monocytogenes como patógeno alimentario. Un enfoque hacia la
industria cárnica**

por

GONZÁLEZ ROSAS, Martín

TESIS DE GRADO presentada como uno
de los requisitos para obtener
el título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Higiene, Inspección-Control y
Tecnología de los Alimentos de Origen
Animal

MODALIDAD Revisión Monográfica

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2015**

PÁGINA DE APROBACIÓN

TUTOR: Dra. Cristina López

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dr. Jorge Fernández

Segundo Miembro (Tutor):

Dra. Cristina López

Tercer Miembro:

Dr. José Pedro Dragonetti

Fecha:

8 de mayo 2015

Autor: Martín González Rosas

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Dra. Cristina López por su disposición y ayuda.

A los funcionarios de biblioteca de Facultad de Veterinaria por su buena disposición, eficiencia y celeridad en la búsqueda de bibliografía, especialmente a Rosina Vilaró.

Al Dr. José Manuel Rodríguez, Dr. Manuel Santa Cruz y Dr. Martín Miller del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca por su constante apoyo, mentoría y sobre todo amistad en ésta última etapa de mi carrera.

A mis padres, Daniel González y Rocío Rosas, quienes han servido de guía y a su vez pilares en mi vida, y sin los cuales hubiese sido imposible alcanzar mis metas.

A mi hermano, Fernando González, por su ayuda incondicional, amistad y compañía en todo momento.

A todos mis amigos, quienes han estado siempre, en las buenas y en las malas, y sé que siempre estarán.

A la Ing. Alejandra Silveira y a Elisa Leberrié por la información brindada que ha sido de gran utilidad.

A mi abuela, tíos, tías, primos y sobrinos por darme una familia excepcional.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTAS DE CUADROS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
OBJETIVOS.....	12
PRESENTACIÓN.....	13
Listeria (genérico).....	13
Listeria monocytogenes.....	13
Serotipos.....	14
Propiedades.....	15
Características bioquímicas.....	15
Temperatura.....	15
pH:.....	16
NaCl:.....	17
Efecto combinado de pH, NaCl y temperatura.....	17
aw.....	17
Sensibilidad y resistencia antibiótica.....	18
Otras propiedades.....	19
Epidemiología.....	19
Hábitat y portadores.....	19
Vías de transmisión.....	20
Estacionalidad.....	22
Período de incubación.....	22
Período de transmisibilidad.....	22
Patogenia.....	22
Principales factores de virulencia.....	23
Características clínicas de la listeriosis en humanos.....	27
Características clínicas de la listeriosis en los animales.....	29
Diagnóstico/Aislamiento en los alimentos.....	30
Tratamiento en humanos.....	37

Recomendaciones generales para la prevención y control de	
Listeria monocytogenes.....	38
Incidencia a nivel mundial.....	39
El panorama en la región.....	45
Normativa existente en nuestro país.....	46
CONCLUSIONES.....	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49
ANEXOS.....	60
Anexo A:.....	61
Anexo B:.....	64

LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

CUADROS

Cuadro I:

Límites del crecimiento de *Listeria monocytogenes*.....18

Cuadro II:

Brotos de listeriosis en el mundo.....21

Cuadro III:

Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes*.....24

Cuadro IV:

Tipos de infección.....29

Cuadro V:

Interpretación bioquímica.....34

Cuadro VI:

Notificación de *Listeria* en humanos, animales y alimentos en la Unión Europea, 2007.....41

Cuadro VII:

Número de casos confirmados e incidencia de listeriosis humana cada 100.000 habitantes en Unión Europea, período 2002-2012.....43

Cuadro VIII:

Brotos con fuerte evidencia o confirmados de *Listeria monocytogenes* en la Unión Europea, período 2008-2012.....43

FIGURAS

Figura I:

Prueba de movilidad a 25 °C.....15

Figura II:

Prueba de CAMP positiva.....15

Figura III:

Representación esquemática de la fisiopatogenia de *L. monocytogenes*.....23

Figura IV:

Ciclo intracelular de *L. Monocytogenes*.....27

Figura V:

Prueba de CAMP.....35

Figura VI:

Aspecto típico de las colonias en CHROMagar Listeria.....37

Figura VII:

Aspecto típico de las colonias en CHROMagar para identificación de Listeria.....37

RESUMEN

Listeria monocytogenes es uno de los microorganismos patógenos reemergentes más relevantes de los últimos años, es responsable de casos individuales y brotes de enfermedades transmisibles por alimentos (ETA); con serias consecuencias en la salud pública. Sus síntomas en el paciente adulto pueden variar desde una gastroenteritis en la forma no invasiva hasta septicemia, meningitis, placentitis y aborto para su forma invasiva, pudiendo llegar hasta la muerte del paciente. Afecta principalmente a los recién nacidos, adultos mayores y personas inmunocomprometidas, con un período de incubación extremadamente variable, con extremos menores a las 24 horas para los casos de gastroenteritis hasta los 90 días en las formas invasivas. Es una bacteria muy extendida en el medio ambiente, con portadores en varias especies como ser: bovinos, ovinos, suinos, aves, equinos y humanos, y su principal vía de transmisión son los alimentos, destacándose dentro de éstos, los alimentos listos para el consumo.

En Uruguay no se han registrado brotes pero si casos individuales de enfermedad causada por éste patógeno, y su presencia ha sido evidenciada en los alimentos.

La normativa en nuestro país respecto a Listeria monocytogenes es escasa; por parte del MSP se la incluyo en el listado A de denuncia obligatoria, y la regulación a nivel industrial a cargo del MGAP está basada la Norma Reglamentaria N° 2/2012 que establece el Muestreo para Determinación de Listeria monocytogenes en Carne Fresca con Destino a la Exportación hacia la Federación Rusa, y en la Norma Reglamentaria N° 1/2013 que establece el Programa de Control Oficial para Listeria monocytogenes en Alimentos Cárnicos Prontos para Comer, y Programa de Autocontrol para Listeria monocytogenes en Medio Ambiente.

En vista de la gravedad de ésta enfermedad, y de las consecuencias que la misma puede tener en la salud pública, así como las repercusiones económicas y dificultades comerciales que podrían resultar de comercializarse carne contaminada con L. monocytogenes; entendemos que es de gran importancia la investigación, difusión, prevención y control de éste microorganismo en nuestro país.

SUMMARY

Listeria monocytogenes is considered as being one of the most relevant reemerging microorganisms in recent years, it has been responsible in individual cases and also in outbreaks of diseases which are transmissible by food (FBDO), leaving serious consequences to the public health. Principal symptoms in adults may range from gastroenteritis in the non-invasive way to septicemia, meningitis, placentitis and abortion for invasive, and can lead to the death of the patient. It mainly affects infants, the elderly and immunocompromised individuals, with extremely variable incubation period, ranging from 24 hours for gastroenteritis cases up to 90 days in invasive way. It is a widespread bacteria in the environment, with carriers in several species such as cattle, sheep, swine, poultry, horses and humans, and its main route of transmission is food, standing within them ready to eat foods.

Uruguay have no documented outbreaks, but individual cases of disease caused by this pathogen have occurred, and its presence has been demonstrated in foods.

The laws in our country regarding Listeria monocytogenes are scarce; by the MSP it was included in the A list of mandatory reporting, and the industrial regulation by the MGAP is based on the Norma Reglamentaria N° 2/2012 which sets the Sampling for Determination of Listeria monocytogenes in Fresh Meat Destined for Export to the Russian Federation, and the Norma Reglamentaria N° 1/2013 which establishes the Official Control Program for Listeria monocytogenes in Ready to Eat Meat Products and Self-Management Program for Listeria monocytogenes in the environment.

In view of the seriousness of this disease, and the consequences that it can have on public health as well as economic impacts, and commercial difficulties which may result from commercializing beef contaminated with L. monocytogenes; we believe that the research, diffusion, prevention and control of this microorganism in our country are of great importance.

Introducción

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) constituyen el mayor peligro para la salud a nivel internacional dado que los alimentos representan la fuente principal de riesgo respecto de los agentes químicos y biológicos, y afectan a todos los países prescindiendo de su nivel de desarrollo (Hammer, 1999).

Las enfermedades transmitidas por los alimentos están aumentando en todo el mundo. Las interconexiones de las actuales cadenas alimentarias mundiales hacen que los patógenos presentes en los alimentos se transmitan más ampliamente y a mayores distancias, aumentando la frecuencia de las ETA y el número de lugares afectados por ellas (OMS, 2014).

El Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) a través de su red FoodNet (Foodborne Diseases Active Surveillance Network) identificó un total de 19.637 casos confirmados de ETA en Estados Unidos para el año 2012, de los cuales 4600 requirieron hospitalización y 69 fallecieron (CDC, 2014a).

En Estados Unidos se calcula que las ETA generan un costo de 3.3 a 5.1 billones de dólares en pérdidas por productividad, 2.3 a 4.3 billones en costos médicos y 9.4 a 15.6 billones de dólares en costos totales (Woller, 2013).

El CDC estima que en los Estados Unidos, cada año 1600 personas se enferman gravemente de listeriosis y 260 de ellas mueren (CDC, 2014b).

Las ETA se definen como cualquier síndrome originado por la ingestión de productos alimenticios y/o agua que contengan agentes causales en cantidades tales, que afecten la salud del consumidor (Díaz y col., 2008).

Las mismas se pueden presentar de 3 diferentes maneras: infecciones causadas por alimentos (se producen por la ingestión de alimentos que poseen microorganismos patógenos vivos), intoxicaciones causadas por alimentos (suceden cuando las toxinas o mohos están presentes en el alimento ingerido) y toxiinfecciones alimentarias, que es producida por el consumo de alimentos que poseen microorganismos patógenos vivos, que al llegar a un lugar propicio en el organismo, se multiplican y liberan toxinas (Stachi, 2007).

También se pueden clasificar a las ETA de acuerdo a su gravedad en baja, moderada y alta, siendo éstas últimas las que generan graves problemas de salud e incluso la muerte como por ejemplo *Listeria monocytogenes* (Stachi, 2007).

A nivel internacional, *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes*, asociados a hamburguesas y carnes listas para consumir, respectivamente, han sido dos de los patógenos que mayor atención han recibido por parte de la investigación debido a la alta probabilidad de causar problemas en la salud de los consumidores (Rovira, 2006).

Los alimentos considerados de alto riesgo para contraer listeriosis son los listos para el consumo (LPC). Ésta es una categoría amplia y heterogénea de alimentos que no van a tener ningún proceso de cocción antes de su consumo, o que aparentemente son aptos para el consumo sin cocción, y varían de unos países a otros en relación con los hábitos alimentarios, la disponibilidad de la cadena de frío y la temperatura máxima en el punto de venta (Muñoz y

col., 2011). También los alimentos conservados a temperaturas de refrigeración durante un período de tiempo prolongado son considerados de alto riesgo, dado que ello permite que las listerias se multipliquen (Doyle, 2001a).

La comida congelada ha tenido una gran penetración en nuestro mercado en los últimos años, pasando de 8.3% de penetración en 1999 a un 14.1% en 2013, y se espera que para el 2014 éste porcentaje ascienda a 15.2% (El País, 2013a).

La industria cárnica es muy importante en nuestro país; tenemos el mayor consumo de carne vacuna por persona, con 61 kg por persona por año, se producen cerca de 550 mil toneladas de carne vacuna al año, de las cuales 180 mil son destinadas al consumo interno y 370 mil se exportan a más de 100 países (INAC, 2014a). Sumado a esto, el consumo de otras carnes como la de ave y suina se ha visto incrementado (INAC 2014b).

El cambio en los hábitos alimentarios debido a un cambio en la forma de vida, ha conducido a un consumo cada vez mayor de alimentos fuera del hogar, lo que ha hecho que cada vez sea mayor la producción de alimentos LPC.

En nuestro país estos alimentos están representados principalmente por los chacinados, los cuales han visto su consumo incrementado en los últimos años (El País, 2013b).

El primer caso de neurolisteriosis registrado en Uruguay fue en 1968 por Galiana y colaboradores (Acuña y col., 2002).

Durante el año 1998 se realizó la identificación de cepas de *Listeria* enviadas al laboratorio de Bacteriología y Virología de la Facultad de Medicina, procedentes del laboratorio de bromatología de la IMM. De las 53 cepas aisladas de alimentos recibidos, 49 correspondieron al género *Listeria* y 21 de ellas fueron identificadas como *L. monocytogenes* (Acuña y col., 2002).

La importancia de la listeriosis para la salud pública no siempre es reconocida, sobre todo porque es una enfermedad relativamente rara, en comparación con otras más comunes como la salmonelosis. Sin embargo, debido a su alta tasa de letalidad (20 a 30 %), la listeriosis se encuentra entre las causas más frecuentes de muerte por enfermedades transmitidas por alimentos ocupando la segunda posición, después de la salmonelosis (Rossi y col., 2008).

El aumento de la esperanza de vida en personas con enfermedades crónicas, el número creciente de pacientes inmunocomprometidos y, en menor medida el sida, han sido considerados como factores que explican un supuesto aumento del número de casos de listeriosis en los últimos años (Julián y col., 2001).

Visto la estrecha relación de *Listeria monocytogenes* con los alimentos LPC y alimentos refrigerados, y las tendencias generales en la forma de consumir los alimentos; el riesgo de que hayan casos esporádicos y/o brotes en nuestro país está presente, y las graves consecuencias que éstos pueden generar tanto a nivel económico como en la salud pública son una realidad, por lo que entendemos que la investigación, difusión y control de éste microorganismo es fundamental.

Objetivos

- Realizar un relevamiento de la información existente sobre *Listeria monocytogenes*
- Recopilar las Normativas vigentes en nuestro país sobre *Listeria monocytogenes* para la industria cárnica en los últimos 10 años
- Presentación de datos sobre la incidencia e impacto de la Listeriosis en nuestro país y el mundo

PRESENTACIÓN

Listeria (genérico)

Las listerias son bacilos Gram positivos que no forman esporas ni son ácido-resistentes (no le favorecen condiciones de excesiva acidez), que fueron clasificadas como “*Listerella*”. El nombre del género se cambió a *Listeria* en 1940 (Jay, 2009). Están filogenéticamente relacionadas con *Lactobacillus*, y al igual que él producen ácido, pero no gas a partir de glucosa. Las listerias necesitan de condiciones microaerofílicas y son catalasa positivo (Madigan, 2003).

El género *Listeria* pertenece a la subrama de *Clostridium* junto con *Staphylococcus*, *Lactobacillus* y *Brochothrix* (Doyle, 2001a). Comprende las siguientes especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua* y *L. grayi* (Rocourt y Buchrieser, 2007). En el año 2010 dos nuevas especies son descubiertas, *L. marthii* (Graves y col., 2010) y *L. rocourtiae* (Leclercq y col., 2010).

Las listerias son el agente etiológico de la listeriosis, una infección alimentaria que puede derivar en bacteriemia y meningitis (Madigan, 2003). Sin embargo solamente *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* se asocian a enfermedades humanas. *L. monocytogenes* es la especie de importancia médica aislada con mayor frecuencia en los laboratorios clínicos, el aislamiento de *L. ivanovii* a partir de hemocultivos y de otras muestras humanas ha sido documentado en raras ocasiones, pero la importancia clínica de ésta sigue siendo dudosa (Acuña y col., 2002).

Debido a que *Listeria* puede crecer en un amplio intervalo de pHs, así como a temperaturas frías, los alimentos con un pequeño número de microorganismos pueden presentar una notable contaminación tras un período prolongado de refrigeración (Murray, 2006).

Listeria monocytogenes es el agente etiológico aproximadamente del 98% de los casos humanos de listeriosis y del 85% de los animales. *L. ivanovii* ha originado al menos tres casos humanos y *L. seeligeri* uno (Jay, 2009).

Listeria monocytogenes

Listeria debe su nombre a Joseph Lister (1827-1912), cirujano y microbiólogo inglés considerado como uno de los padres de la microbiología junto a Koch y Pasteur; también figura en la historia como precursor de la antisepsia. Sin embargo, Lister no tuvo relación con la *Listeria*, ya que ésta fue descubierta 14 años después de su muerte, en 1926, por Murray, Webb y Swann, microbiólogos de la Universidad de Cambridge, quienes aislaron el microorganismo de conejos de laboratorio y lo bautizaron como *Bacterium monocytogenes*. Casi simultáneamente James Pirie describió el mismo bacilo en un roedor con fiebre y monocitosis en Kenia y lo llamó *Listerella hepatolytica*, pues le dio más importancia al daño hepático que a la monocitosis periférica. Luego otros investigadores aislaron la misma bacteria y le dieron diferentes nombres. Esta confusión fue resuelta en 1957 por el alemán Heinz Seeliger, conocido taxónomo, quien en honor a Lister impuso el nombre *Listeria monocytogenes* (Ledermann, 2008).

Listeria monocytogenes es una bacteria ácido-tolerante, halotolerante y anaeróbica facultativa (Madigan, 2003). Su morfología es de un bacilo corto, es Gram positivo y dotado de movilidad extracelular (flagelos peritricos) e intracelular (filamentos de actina) (Frazier, 1993). Esta movilidad intracelular se debe a que la bacteria libera una proteína (A'ctA) que genera una polimerización de filamentos de actina a partir de la propia actina de la célula hospedadora, así se forma una fibra de actina que queda atrapada en el citoesqueleto de la misma, con su constante elongación permite el movimiento hacia adelante del patógeno en el citosol (Prescott, 2004).

Son microorganismos móviles por medio de 1 a 5 flagelos peritricos, los cuales se generan mejor a temperaturas menores de 25 °C, siendo su motilidad mayor a temperatura ambiente que por incubación a 36-37 °C, ya que a estas temperaturas son aflagelados o tienen sólo un flagelo y aparecen como inmóviles (Stachi, 2007).

Listeria monocytogenes es un agente causal de enfermedad transmitida por los alimentos (ETA), y más específicamente de infección alimentaria.

Es una bacteria invasiva, sus mecanismos de patogenicidad son poco entendidos aún, la característica más importante del germen es su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos (Martino y col., 2008).

Esta bacteria puede ser aislada de suelo, agua, vegetales y contenido fecal de una amplia gama de animales; es un contaminante común de alimentos frescos y procesados, de origen animal y vegetal (hortalizas), leche y lácteos no pasteurizados, carne de vaca, cerdo y aves, embutidos ahumados o fermentados y pescados ahumados (Benadof, 2008). Se presenta en casos esporádicos o brotes. Entendiéndose por brote aquel episodio en el cual dos o más personas presentan una enfermedad similar después de ingerir alimentos, incluida el agua, del mismo origen y donde la evidencia epidemiológica o el análisis de laboratorio implica a los alimentos y/o al agua como vehículos de la misma (Guía VETA, 2001).

El primer caso humano descrito se presentó en un soldado de la Primera Guerra Mundial que padecía meningitis (Doyle, 2001a). Sin embargo no fue hasta 1981 que se comprobó científicamente el primer brote de listeriosis de origen alimentario, desde entonces se han registrado brotes en todo el mundo, ocurriendo mayoritariamente en Estados Unidos y Europa (Rossi y col., 2008).

Serotipos

L. monocytogenes está representada por 13 serovariedades (1/2a, b, c; 3a, b, c; 4a, ab, b, c, d, e, 7) (Jay, 2009), todas ellas con la capacidad de ser patógenas, sin embargo son las serovariedades 1/2a, 1/2b, y 4b las aisladas en el 95% de los casos humanos (Doyle, 2001a). Las cepas 4b se asocian con mayor frecuencia a brotes, mientras que las cepas 1/2 se asocian a aislamientos de alimentos (Jay, 2009).

Propiedades:

Características bioquímicas

Las especies del género *Listeria* comparten características comunes que se detallan a continuación.

Poseen bajo contenido de guanina y citosina (36 a 42%) en su DNA (Doyle, 2001a).

Poseen un metabolismo anaeróbico facultativo; son aerófilas pero se desarrollan bien en microaerofilia. Se tiñen positivamente a la tinción de Gram. Producen ácidos a partir de carbohidratos. Son productoras de catalasa y la oxidasa es negativa. Tanto la prueba del rojo de metilo como la de Voges-Proskauer son positivas. Producen hidrólisis de esculina en horas. No hidrolizan gelatina ni urea. No producen indol, ni ácido sulfúrico (Stachi, 2007).

L. monocytogenes posee características que son esenciales para su diagnóstico.

Presenta motilidad a 25 °C que en medio semisólido se observa en forma de paraguas cercano a la superficie (Figura I) y la prueba de CAMP es positiva (Figura II) (Benadof 2008). Produce ramnosa pero no xilosa y la prueba de hemólisis es positiva (OIE, 2013).

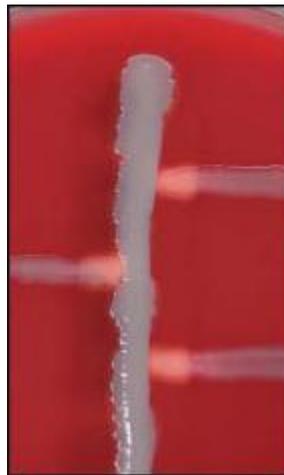
Figura I



Prueba de movilidad a 25 °C

Fuente: Benadof, 2008.

Figura II



Prueba de CAMP positiva

Fuente: Benadof, 2008.

Temperatura

Esta bacteria no crece a temperaturas superiores a los 45°C y la temperatura mínima para su desarrollo es de $1.1 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$, con un rango de 0.5° a 3.0°C (Jay 2009). El calor la destruye; por ejemplo, temperaturas de 73°C durante un minuto en el centro térmico de un chorizo son suficientes para destruir poblaciones de 10^3 (Molina y col., 2009).

El calentamiento de pollos hasta 70°C en microondas y la cocción “a medias” de la carne vacuna no impide su supervivencia (ICMSF 5, 1998).

En productos cárnicos el agregado de grasa vacuna parece no incidir en la resistencia de *L. monocytogenes* al calor, sin embargo la sal de curado si la incrementa sustancialmente. El fenómeno del choque térmico debe ser tenido en consideración cuando se calientan carnes,

especialmente para productos que son calentados lentamente hasta su temperatura final (Soyutemiz y Cetinkaya, 2005).

Su resistencia a tratamientos térmicos se puede ver aumentada a causa de procesos de limpieza y sanitización ineficientes con detergentes o desinfectantes alcalinos, pero la exposición al cloro aumenta su sensibilidad al calor (Taormina, 2001).

Una pasteurización convencional (15 segundos a 72 °C) puede provocar de 10 a 250 reducciones decimales. Se ha observado una diferencia sustancial en cuanto a la resistencia térmica entre cepas de acuerdo al serotipo, cepas pertenecientes al serogrupo 1 fueron más resistentes que las pertenecientes al serogrupo 4 (Lemaire y col., 1989).

En la leche, tanto la pasteurización baja (62-68°C por 30 minutos) como la pasteurización alta (71-77°C por 15 segundos) destruyen al microorganismo, sin embargo, los márgenes de seguridad son bastante menores para ésta última, lo que implicaría una supervivencia de *L. monocytogenes* si el recuento celular inicial es alto (Mackey y Bratchell., 1989).

L. monocytogenes es capaz de sobrevivir y multiplicarse a temperaturas de refrigeración (1-8°C) (Saunders y Wiedmann, 2007), por ejemplo el límite inferior de crecimiento para alimentos con un pH neutro y un elevado contenido de nutrientes fue de aproximadamente 0°C. El organismo resiste bien durante varias semanas a -18°C en varios sustratos alimenticios y es posible que el almacenamiento en congelación (-18°C a -198°C) durante un mes destruya muy pocas listerias (ICMSF 5, 1998).

La resistencia de *L. monocytogenes* a los tratamientos térmicos es mas variable de lo que podría pensarse en un principio, y ésta variabilidad es debida a factores como la cepa involucrada, la fase de crecimiento, las condiciones del medio (contenido de NaCl, temperatura, pH, aw, presencia de inhibidores), velocidad de cocción y el estrés (choque térmico, choque ácido, exposición a sales y otros solutos) al que pueden ser sometidas las bacterias (Doyle y col., 2001b). Todos estos factores interactúan entre si para crear una respuesta dinámica a la resistencia térmica de *L. monocytogenes*, en algunos casos disminuyéndola, y en otros aumentándola.

pH:

El pH de crecimiento para *L. monocytogenes* se encuentra en un rango de 4.39-9.4 (ICMSF 5, 1998), siendo el pH óptimo 7 (Rocourt y Buchrieser, 2007). Sin embargo, se ha demostrado que ciertas cepas pueden tolerar rangos mucho más amplios de pH (3.0-12.0) (Liu y col., 2005). De todas formas, el pH mínimo de crecimiento dependerá de la temperatura de incubación, composición general de nutrientes del sustrato de crecimiento, actividad de agua y de la presencia de NaCl y otras sales inhibitoras (Jay, 2009).

La susceptibilidad al ácido es dependiente de la fase de crecimiento. Cultivos de la fase estacionaria de crecimiento son naturalmente resistentes a pH ácidos (3.5), mientras que cultivos de la fase exponencial requieren adaptación previa a pH más elevado (O'Driscoll y col., 1996). Dosis subletales de pH de entre 4.5-5.0 en la fase de crecimiento exponencial probaron aumentar la resistencia de *L. monocytogenes* a dosis letales de ácido (pH 3.5) y otros compuestos como etanol y H₂O₂ (Lou y Ahmed, 1997). Esto es debido a una modificación en los patrones de síntesis proteica en la bacteria que reprime la expresión de

ciertas proteínas e incrementa la expresión de otras, resultando en un aumento de la tolerancia ácida (Phan-Thanh y Montagne, 1998).

En un estudio llevado a cabo con 127 cepas diferentes de *L. monocytogenes* previamente adaptadas a pH 5.0, y luego incubadas a 25°C en un caldo infusión cerebro-corazón se verificó que la mayoría (95%) pudo desarrollarse a un pH de 4.2, mientras que un porcentaje menor (25%), lo hizo a pH de 4.1 (Shabala y col., 2008), esto pone en evidencia la variabilidad entre cepas en cuanto a límites de crecimiento, y que éstos pueden diferir de los valores generalmente aceptados.

A su vez dentro de una misma cepa existen variantes o subpoblaciones que difieren en su susceptibilidad al ácido. Esto da lugar a dinámicas interesantes en las poblaciones de *Listeria*. Tratamientos ácidos considerados como efectivos para eliminar a ésta bacteria podrían dejar una subpoblación de variantes ácido-resistentes, las cuales en las condiciones adecuadas, podrían desarrollarse y significar un verdadero riesgo en materia de inocuidad (Metselaar y col., 2013).

NaCl:

L. monocytogenes es capaz de crecer en presencia de un 9% de NaCl (Zarei y col., 2012) y de sobrevivir a niveles elevados (30%) de NaCl (Doyle, 2001).

En presencia de sal éste patógeno genera proteínas (proteínas de shock salino y proteínas de aclimatación al estrés) que están íntimamente vinculadas a su supervivencia en medios con altas concentraciones de NaCl (Duché y col., 2002).

Efecto combinado de pH, NaCl y Temperatura

Varios estudios han sido realizados sobre la interacción del NaCl con el pH y la temperatura, y se ha llegado a la conclusión de que los efectos del NaCl y el pH son aditivos y no presentan ningún tipo de sinergismo (Jay, 2009). Extrañamente, bajas concentraciones de sal (4-6%) parecen brindarle una escasa protección contra pH ácidos (Cole y col., 1990).

La temperatura es un factor influyente en la supervivencia de *L. monocytogenes* cuando es sometida a estrés ácido y osmótico. A bajas temperaturas (5°C, 10°C), la bacteria pudo sobrevivir durante más tiempo altas concentraciones de sal y bajo pH que cuando se la sometió a temperaturas mayores (30°C) bajo las mismas condiciones (Cole y col., 1990).

aw:

Los solutos como la sal y el azúcar, así como los mecanismos de deshidratación disminuyen el agua disponible y reducen el rango de crecimiento microbiano (Leyva, 2008).

L. monocytogenes tiene un límite inferior de aw de crecimiento de aproximadamente 0.90 a 30 ° C cuando se utiliza glicerol para controlar dicha actividad. A su vez, se han citado límites de 0.92 y 0.93 utilizando NaCl y sacarosa, respectivamente (ICMSF 5, 1998). Estos datos evidencian que éste microorganismo sigue a los estafilococos como patógeno de origen alimentario capaz de crecer a valores de aw <0.93 (Jay 2009).

Cuadro I: Límites del crecimiento de *Listeria monocytogenes*

	<i>Mínimo</i>	<i>Óptimo</i>	<i>Máximo</i>
Temperatura (°C)	-0.4	37	45
pH	4.39	7.0	9.4
Actividad de agua	0.92	-	-

Fuente: ICMSF 5, 1998.

Sensibilidad y resistencia antibiótica

En el informe “*Listeria* y listeriosis”, publicado por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología se señala que el patrón de sensibilidad a los antibióticos ha permanecido estable con el paso de los años. Éste microorganismo es sensible a una amplia gama de antibióticos como la penicilina, ampicilina, gentamicina, eritromicina, tetraciclinas, rifampicina, cotrimoxazol y vancomicina. Presentan una pobre actividad las fluoroquinolonas actuales y las cefalosporinas, especialmente las de tercera y cuarta generación como cefotaxima y cefepima (Oteo y Alós, 1997).

La mayor parte de los antibióticos tienen actividad bacteriostática frente a *L. monocytogenes*. Solamente se ha observado actividad bactericida en los aminoglucósidos, glucopéptidos y cotrimoxazol (sulfametoxazol asociada a trimetoprima) (Oteo y Alós, 1997).

La Organización Mundial de la Salud define a la resistencia a los antimicrobianos como aquel fenómeno por el cual un microorganismo deja de verse afectado por un antimicrobiano al que anteriormente era sensible (OMS, 2012).

En un estudio llevado a cabo con 14 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de diferentes productos de origen animal, se observó que todas ellas eran susceptibles a penicilina G, vancomicina, tetraciclina, cloranfenicol, rifampicina, eritromicina, gentamicina y trimetoprim. Sin embargo, se obtuvieron porcentajes altos de resistencia a la fosfomicina (92.9%) y menores para la estreptomina (7.1%) (Altuntas y col., 2012). También se han observados altos porcentajes de resistencia a clindamicina (Safdar y Armstrong, 2002. Zamora y col., 2006).

En otro estudio se evaluó la resistencia de diferentes especies de *Listeria* a varios antibióticos, y se observó que el 0.6% de los aislamientos de *L. monocytogenes* eran resistentes a uno o más antibióticos comparado con el 19.5% de los aislamientos de *L. innocua*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri* no presentaron resistencia. Resistencia a las tetraciclinas y penicilinas fueron las observadas más comúnmente. También se detectó un aislamiento resistente a gentamicina, lo cual es preocupante, ya que la gentamicina en combinación con ampicilina es usada en el tratamiento de listeriosis humana (Walsh y col., 2001).

La baja resistencia de *L. monocytogenes* a los antibióticos todavía no presenta un riesgo para la salud pública, pero ésta situación podría cambiar. Varios investigadores han sugerido que diferentes especies de *Listeria*, como *L. innocua* (la cual ya presenta frecuentes resistencias) podría transferirle ésta información genética a *L. monocytogenes*. A su vez, *Listeria* puede adquirir resistencias a partir de otros géneros bacterianos con los que está poco emparentados (Balsalobre y Hernández, 2004).

Otras propiedades:

La dosis infecciosa de *L. monocytogenes* depende de varios factores, que incluyen el estado inmunológico del hospedador y las características microbianas. La aparición y el curso de la infección pueden depender de los factores de virulencia y de la dosis infecciosa. Debido a la gravedad de la enfermedad, las pruebas con voluntarios humanos son inviables (Doyle, 2001).

Debido a estos factores la dosis mínima requerida para causar infección clínica en humanos no ha sido determinada, sin embargo el gran número de *L. monocytogenes* detectadas en los alimentos responsabilizados de casos esporádicos y epidémicos de listeriosis (10^6) sugiere que es alta. Niveles de 10^2 a 10^4 células de *L. monocytogenes* por gramo de alimento han sido asociados con listeriosis en humanos, especialmente en pacientes inmunosuprimidos, ancianos y mujeres embarazadas (Torres y col., 2005).

En cuanto a la resistencia en el medio ambiente, se ha comprobado que sobreviven en suelos húmedos durante 295 días y más (Welshimer, 1960), y más de 8 semanas en agua de estanque (Botzler y col., 1974).

Otra propiedad que posee *L. monocytogenes* es la capacidad de formar biofilms. Un biofilm consiste en el desarrollo de bacterias, hongos y protozoos, por separado o combinados, unidos por una matriz extracelular que se fija a una superficie sólida o firme (Jay, 2009). Las células en los biofilms pueden persistir en el ambiente y resistir la desecación, luz ultravioleta, y el tratamiento con agentes antimicrobianos y sanitizantes (Borucki y col., 2003). De ésta manera pueden volverse una fuente crónica de contaminación microbiana, alterando los alimentos, o transmitiendo enfermedades (Stepanović y col., 2004).

Epidemiología:

La listeriosis está dentro del grupo de las enfermedades reemergentes en nuestro país, entendiéndose como tales, aquellas enfermedades ya conocidas, que en un pasado no presentaron un problema para la salud pública, pero que en las últimas décadas han tenido un claro aumento en su incidencia (Conti, 2001).

Listeria se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza. En los animales domésticos la listeriosis tiene principalmente un origen alimentario, al igual que en los humanos (Ramaswamy y col., 2007).

Hábitat y portadores:

Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente. Se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada, desechos de los mataderos, así como del tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos. *L. monocytogenes* se ha aislado de varias especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos. No obstante su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprofito (Oteo y Alós, 1997).

L. monocytogenes parece ser un residente normal del tracto intestinal de los humanos; esto podría explicar el por qué anticuerpos contra *Listeria* spp. son comúnmente encontrados en

personas saludables (Farber y P. I. Peterkin, 1991) con una frecuencia que va de menos del 1% hasta el 15% (Jay 2009).

El microorganismo no ha sido aislado en las muestras orofaríngeas de personas sanas, y la presencia del mismo en las muestras cervicovaginales siempre está asociada con la listeriosis relacionada con el embarazo. El papel de los portadores sanos en la epidemiología de la listeriosis es dudoso y da pie para que sea más estudiado (Doyle, 2001).

El estado de portador fecal asintomático es común en el ser humano (hasta 10%) y ha sido mucho más frecuente en trabajadores de rastros y en personal de laboratorio que manipula cultivos de *Listeria monocytogenes* (Chin, 2001).

Los rumiantes domésticos jugarían un papel clave en el mantenimiento de *Listeria* en el ambiente rural, a través de un ciclo de enriquecimiento fecal-oral. Se considera que el ganado ovino es el que presenta mayor excreción intestinal de *Listeria* (Stachi 2007), esto podría deberse a una mayor susceptibilidad por parte de los ovinos, ya que los mismos presentan tasas de incidencia mayores (hasta 30%) que los bovinos (hasta 15%) (Wesley, 2007).

Los cerdos raras veces desarrollan la enfermedad y, generalmente, las aves son portadoras subclínicas del microorganismo (OIE, 2013).

L. monocytogenes también puede estar presente en el cuero y lana de los rumiantes. En Nueva Zelanda el cuero vacuno y la lana ovina parecen ser las mayores fuentes de contaminación de *L. monocytogenes* para las carcasas (ICSMF 6, 2005). Un estudio realizado en un matadero bovino de la provincia de Parma, Italia, demostró que las heces y el cuero de los bovinos son importantes vehículos para la bacteria, y que las buenas prácticas de faena son fundamentales para reducir la contaminación de las carcasas por la misma (Bonardi y col., 1997).

Vías de transmisión:

A pesar de ser considerada una zoonosis que puede ser transmitida por contacto directo con animales infectados (exposición ocupacional), la mayoría de las infecciones humanas se adquieren por ingestión de alimentos contaminados y de madre a hijo intrauterino o durante el parto (Rossi y col., 2008).

La contaminación alimentaria, tanto en forma de epidemias como de casos esporádicos, en una población de inmunodeprimidos, constituyen los dos factores fundamentales para la presentación de la enfermedad (Cisternas y col., 2002).

Entre los alimentos que pueden causar el trastorno se encuentran leche no pasteurizada y productos lácteos elaborados con leche no pasteurizada, quesos blandos, hortalizas frescas (rábanos, pepinos, col, papas), mariscos crudos y productos derivados del pescado (especialmente pescado ahumado), carnes y productos cárnicos, que incluyen la carne de vaca, de cerdo, de pollo, carne picada, el jamón, los embutidos ahumados y fermentados, el salami, y el paté (Doyle, 2001a).

A pesar de que son muchos los alimentos que pueden contaminarse con *L. monocytogenes*, los casos están principalmente relacionados con alimentos listos para el consumo (LPC).

Según el Reglamento (CE) 2073/2005 los alimentos listos para el consumo son aquellos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos (Anónimo, 2005).

Varios brotes han sido asociados con el consumo de éstos alimentos, tales como leche cruda, quesos blandos, pescado ahumado y productos cárnicos y embutidos fileteados (EFSA, 2007).

La enfermedad en rumiantes está asociada a la alimentación con silo que contiene la bacteria. Sobre todo, silos que no han sido conservados en buenas condiciones y sus capas superiores no alcanzan el pH adecuado para inhibir el crecimiento de la bacteria (Stachi, 2007).

En el siguiente cuadro se evidencia como los vegetales crudos, los productos lácteos y las carnes han sido implicados en importantes brotes humanos en el pasado reciente.

Cuadro II: Brotes de listeriosis en el mundo

País	Año	Nº de casos	Nº de muertes	Serotipo	Alimento
Halifax, Canadá	1981	41	18	4 b	Coles
Massachusetts, USA	1983	49	14	4 b	Leche
Vaud, Suiza	1983-87	122	34	4 b	Queso
California, USA	1985	142	48	4 b	Queso
Reino Unido	1989-90	300	0	4 b	Paté
Francia	1992	279	88	4 b	Lengua de cerdo
Francia	1993	39	0	4 b	Paté de cerdo
Francia	1995	36	0	4 b	Queso blando
Multiestados, USA	1998-99	40	4	4 b	Carne feteada
Finlandia	1988-99	25	6	3 a	Manteca
Francia	1999	29	7	NI	Lengua de cerdo
Multiestados, USA	2000	29	4	4 b	Pavo feteado
Carolina del Norte, USA	2000-01	12	0	4 b	Queso
Multiestados, USA	2002	46	7	NI	Pollo y pavo
Québec, Canadá	2002	17	0	NI	Queso

NI: serovariedad no informada

Fuente: Adaptado de Callejo y col., 2008.

La transmisión de *L. monocytogenes* del ganado a los humanos se da por contacto directo con los animales, especialmente durante el parto de vacas y ovejas; y el consumo de leche sin pasteurizar. Aparte de la listeriosis humana por contacto directo con animales infectados o por consumir productos de origen animal contaminados, las conexiones entre listeriosis humana y animal son poco claras (Wesley, 2007).

La Organización Mundial de la Salud concluyó que la listeriosis alimentaria es principalmente transmitida por mecanismos no zoonóticos y que *L. monocytogenes* es un organismo ambiental cuya vía primaria de transmisión a los humanos es por la comida contaminada durante su producción (Wesley, 2007).

Otros mecanismos de transmisión de la listeriosis humana son la vía transplacentaria o por un canal de parto infectado (madre-feto), y la vía perinatal (al neonato durante el nacimiento), con objetos contaminados, o por infecciones cruzadas en las guarderías neonatales (Lorber, 2010). También ha sido implicado el aceite mineral en un brote de listeriosis neonatal, y se han observado infecciones cutáneas primarias sin implicación sistémica como enfermedad profesional en veterinarios y granjeros debido a la manipulación de fetos bovinos o de vacas presuntamente infectadas (Doyle, 2001).

Estacionalidad

La listeriosis humana es una enfermedad esporádica que se ve durante todo el año, aunque su incidencia máxima ocurre en los meses cálidos (Murray, 2006).

Período de incubación

El período de incubación en humanos de la listeriosis invasiva es entre 20 y 30 días (Riedo y col., 1994), con extremos de 3 a 90 días (Acuña y col., 2002), mientras que para el cuadro de gastroenteritis los síntomas clínicos generalmente comienzan a las 20 horas de ingerido el alimento contaminado (Vázquez y col., 2001).

Período de transmisibilidad

Las madres de los recién nacidos infectados pueden dispersar el agente infeccioso con las secreciones vaginales y la orina de 7 a 10 días después del parto, y rara vez por más tiempo. A pesar de ello, las personas infectadas pueden excretar los microorganismos en las heces durante varios meses (Chin, 2001).

Patogenia

La patogénesis de la infección por *Listeria* en humanos y animales es aún poco entendida. La mayor parte de la información con la que se cuenta deriva de observaciones hechas en animales de experimentación. Como la comida contaminada es la mayor fuente de infección tanto para casos epidémicos como esporádicos, el tracto gastrointestinal es la principal vía de entrada para este patógeno al hospedero (Vázquez y col., 2001).

Esta bacteria es capaz de atravesar las tres barreras fisiológicas: intestinal, hemato-encefálica y placentaria. Al cruzar la barrera intestinal, la bacteria es absorbida desde la luz intestinal, atravesando el epitelio, y si el sistema inmune no controla la infección, el patógeno se disemina a la corriente sanguínea y los ganglios linfáticos mesentéricos. Luego, *L.*

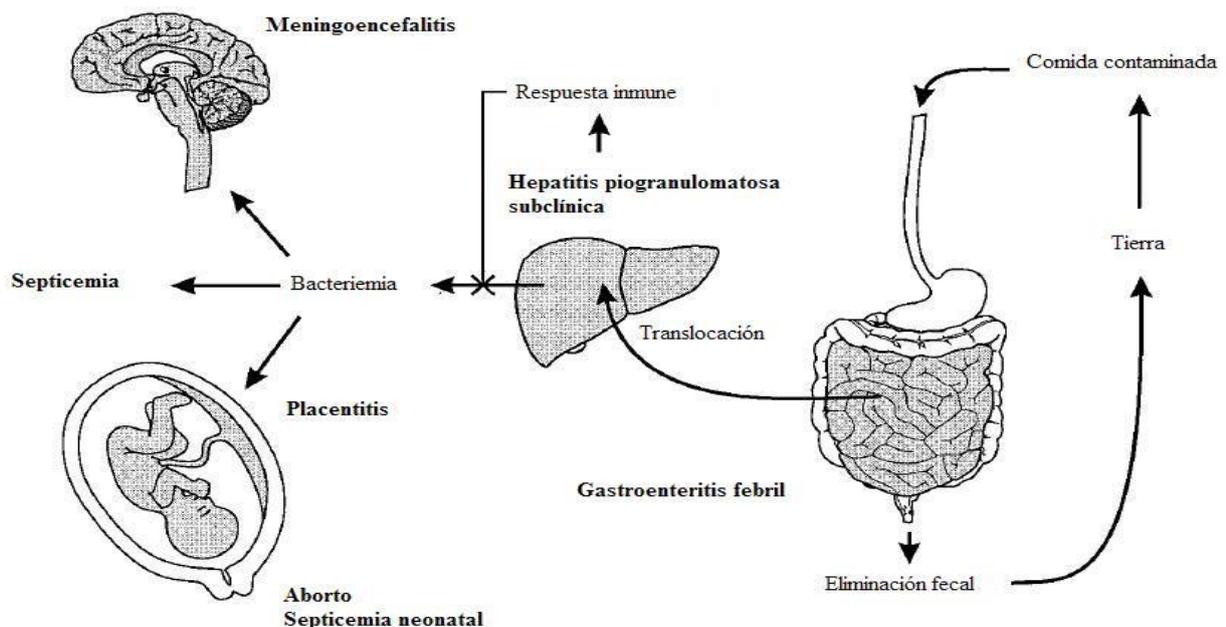
monocytogenes llega al hígado y al bazo, donde se replica, preferentemente dentro de macrófagos y células epiteliales (Camejo y col., 2011).

Durante las etapas tempranas de colonización hepática, los polimorfonucleares son reclutados en los sitios de infección (hepatitis piogranulomatosa subclínica), en respuesta a la liberación de quimioattractantes por parte de los hepatocitos (Torres y col., 2005).

Si la replicación no es contenida por la inmunidad innata del hospedero, la bacteria es capaz de escapar y continuar replicándose. Por lo tanto, la supervivencia del hospedero es dependiente de una efectiva respuesta inmune adaptativa, la cual en caso de fallar, le permitirá a la bacteria reingresar al torrente sanguíneo y alcanzar el cerebro (meningoencefalitis) o la placenta (placentitis), causando una infección sistémica potencialmente fatal (Camejo y col., 2011).

Con la capacidad de multiplicarse en el citosol de la célula hospedadora y diseminarse de célula a célula, *L. monocytogenes* puede difundirse por los tejidos del hospedero y a su vez protegerse contra la inmunidad humoral del mismo (Ramaswamy y col., 2007).

Figura III: Representación esquemática de la fisiopatogenia de *L. monocytogenes*



Fuente: Adaptado de Vázquez y col., 2001.

Principales factores de virulencia

El proceso de infección comprende varias etapas: adhesión e invasión de la célula hospedadora, escape de la vacuola, multiplicación intracelular y propagación intercelular (Chen y col., 2009), en las cuales actúan diferentes factores de virulencia como se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro III: Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes*

Factor de virulencia	Función
Listeriolisina (LLO)	Lisis del fagosoma
Fosfatidilinositol fosfolipasa C (PI-PLC)	Lisis del fagosoma
Fosfatidilcolina fosfolipasa C (PC-PLC)	Lisis del fagosoma
Precursor zinc metaloproteasa (Mpl)	Procesa al precursor PC-PLC a su forma madura
Factor regulador positivo A (PrfA)	Requerida para la expresión de los factores de virulencia de <i>L. monocytogenes</i>
Proteína inductora de ensamblaje actina (ActA)	Participa en la movilidad intra-intercelular
Proteína translocadora de hexosa fosfato (Hpt)	Requerida para el crecimiento intracelular
Internalina A (InlA)	Participa en la invasión celular
Internalina B (InlB)	Molécula señalizadora y participa en la invasión celular
Internalina C (InlC)	Proteína secretada, contribuye a la virulencia
Internalina J (InlJ)	Adhesión celular, contribuye a la virulencia

Fuente: Adaptado de Vázquez y col., 2001, Camejo y col., 2011, Chico y col., 2001.

Adhesión celular

La adhesión a las células del hospedero es una etapa fundamental en la patogenicidad bacteriana (Pizarro y Cossart, 2006). Para *L. monocytogenes* se ha descrito la participación de varios factores que permiten establecer un contacto íntimo con las células del hospedero, destacándose las proteínas Lap, Ami, FbpA, LapB e InlJ. Lap es una adhesina que está presente en todas las especies de *Listeria* spp. con excepción de *L. grayi*, Ami, amidasa autocatalítica, FbpA, proteína de superficie homóloga a las proteínas atípicas de unión a fibronectina. Además, FbpA parece ejercer un rol de chaperona para los factores de virulencia InlB y LLO (Camejo y col., 2011), estabiliza o permite la secreción correcta de ellos (Dramsi y col., 2004).

LapB es una proteína necesaria para la adhesión y el ingreso en líneas celulares de mamíferos, además se ha informado que especies no patógenas de *Listeria* carecen de la misma. Por último, la proteína InlJ, perteneciente a la familia de las internalinas (Inl) actúa como adhesina. Su papel en la virulencia queda demostrado al infectar ratones con cepas mutantes de *L. monocytogenes*, a las cuales se les ha removido el gen inlJ (responsable de codificar InlJ), ya que las mismas sufrieron una disminución significativa en su virulencia (Camejo y col., 2011).

Invasión celular

La internalización de la bacteria dentro de células no fagocíticas está mediada por dos proteínas de superficie, InlA e InlB, las cuales forman parte de una gran familia de proteínas

llamadas internalinas, compuesta por 25 proteínas de *L. monocytogenes* (Bonazzi y col., 2009).

Estas proteínas se unen a proteínas de la superficie de la célula hospedadora. InlA se une al receptor E-cadherina (proteína transmembrana mediadora de las uniones intercelulares), localizada en diferentes tipos de células epiteliales, dentro de las cuales están los enterocitos, por lo tanto ésta proteína juega un rol fundamental en el pasaje a través de la barrera intestinal por parte de la bacteria (Bonazzi y col., 2009).

A diferencia de lo que ocurre con la InlA, la InlB no interactúa con el receptor E-cadherina, sino que lo hace con el receptor para el factor de crecimiento del hepatocito (receptor Met) (Shen y col., 2000), el cual también se expresa en los enterocitos y su activación puede resultar en disrupción de las uniones intercelulares (Lecuit y col., 2001).

El receptor Met es expresado ubicuamente, lo cual le permite a la InlB mediar la internalización bacteriana en un amplio rango celular, mientras que la InlA muestra un tropismo más específico, ya que la E-cadherina solamente se expresa en un número limitado de tipos celulares, principalmente epiteliales (Bonazzi y col., 2009).

Sobrevivencia, multiplicación y extensión célula-célula

Luego del ingreso a la célula hospedera, *L. monocytogenes* es rodeada temporalmente por una vacuola fagocítica de membrana simple. El escape de ésta vacuola lo facilitan la toxina listeriolisina O (LLO) (una proteína de 58 kDa codificada por el gen *hly*) y dos fosfolipasas C (PLC): fosfatidilinositol-fosfolipasa (PI-PLC) (una proteína de 33 kDa codificada por el gen *plcA*) y fosfatidilcolina-fosfolipasa (PC-PLC) (de 29 kDa y codificada por el gen *plcB*) (Liu y col., 2007). Ésta última es secretada en su forma inactiva para prevenir el daño a la membrana de la propia bacteria, posteriormente es llevada a su forma activa por medio de una metaloproteasa dependiente de zinc, Mpl (Vázquez y col., 2001).

LLO es una toxina dependiente del colesterol que es esencial para la virulencia de *L. monocytogenes*, ya que forma poros en el fagosoma y facilita la salida al citoplasma de la misma (Gedde y col., 2000). La actividad citolítica de LLO se ve facilitada por la acción de PI-PLC, que tiene como sustrato al fosfatidilinositol y por PC-PLC, una lecitinasa, con actividad enzimática sobre fosfatidilcolina, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina (Vázquez y col., 2001).

Una vez libre en el citosol *L. monocytogenes* comienza la replicación, duplicando su población en aproximadamente una hora (Vázquez y col., 2001). Para su crecimiento ésta bacteria utiliza hexosas fosfato (HP) (carbohidratos fermentables, residuos del metabolismo glicolítico celular) como fuente de carbono y energía, lo cual lo hace a través del translocador hexosa fosfato (Hpt), codificado por el gen *hpt*, éste transportador es un homólogo bacteriano del translocador mamífero que transporta glucosa-6-fosfato (G6P) desde el citosol hacia el retículo endoplásmico, en el caso de *L. monocytogenes* el mismo transporta G6P y otras HP, como G1P y F6P desde el citosol de la célula hospedera hacia el interior de la célula bacteriana (Chico y col., 2001).

Luego de la replicación se produce otra proteína, ActA, la cual dirige una polimerización de filamentos de actina en un polo de la bacteria, formando una estructura conocida como “cola de cometa”. Ésta estructura le permite a la bacteria desplazarse en el citosol para llegar a la

periferia y formar un pseudópodo (listeriopodo) que facilitará la infección de otra célula vecina. Estos pseudópodos son fagocitados por las células vecinas, resultando en fagosomas secundarios con una doble membrana (la interna de la célula donante y la externa de la nueva célula hospedera) los cuales son rápidamente lisados por LLO, PC-PLC y PI-PLC, para luego comenzar un nuevo ciclo (Liu y col., 2007, Vázquez y col., 2001, de las Heras y col., 2011).

Otros factores vinculados a la virulencia son la proteína p60 y los mediadores de respuesta al estrés (ClpC, ClpE y ClpP).

La proteína p60 es una proteína de 60 kDa codificada por el gen *iap*, está presente en todas las especies de *Listeria*, es una hidrolasa murámica y tiene un rol fundamental en la división celular (Wuenschel y col., 1993).

ClpC es una proteína codificada por el gen *clpC* y perteneciente a una familia de proteínas vinculadas a la tolerancia al estrés (HSP-100/Clp) en muchos organismos procariontas y eucariotas, en *L. monocytogenes* favorece la salida temprana de los fagosomas de los macrófagos, mejorando la supervivencia intracelular (Rouquette y col., 1998), también facilita la propagación célula a célula (de las Heras y col., 2011).

ClpE es codificada por el gen *clpE* y pertenece a la misma familia que ClpC, actuando en sinergismo con ésta en la división celular, ambas jugando un papel fundamental tanto en la virulencia como en la división celular (Nair y col., 1999).

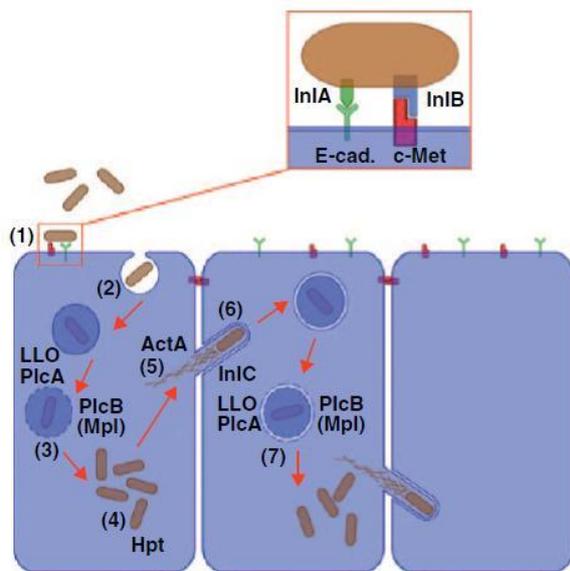
Por último, y también perteneciente a la familia HSP-100/Clp está la proteína ClpP, de unos 21.6 kDa y codificada por el gen *clpP*. La misma cumple un rol fundamental en lograr una rápida respuesta adaptativa intracelular por parte de *L. monocytogenes* en el proceso infeccioso, lo cual se ha demostrado evidenciando la reducida actividad de LLO en mutantes carentes del gen *clpP* (Galliot y col., 2000).

Regulación de la virulencia

Listeria monocytogenes pasa de organismo saprofito a parásito intracelular cuando invade a un hospedero, de esta manera evita la producción de factores de virulencia cuando no son necesarios (estado de saprofito), maximizando la sobrevivencia de la bacteria en su vida extracelular. Esto requiere la regulación de los principales genes de virulencia (*plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *hpt*), la misma tiene como actor central a la proteína PrfA, la cual puede activar o reprimir la expresión de dichos genes (de las Heras y col., 2011).

PrfA es un homodímero con dos dominios, el dominio N-terminal y el dominio C-terminal, el cual tiene forma de hélice y es donde se establece el contacto con el ADN. Este contacto se da en un sitio específico del ADN, activando la transcripción para los factores de virulencia (Scotti y col., 2007). Se ha descrito que PrfA puede regular los nueve genes de virulencia ya mencionados, además de 145 genes no relacionados con virulencia (de las Heras y col., 2011).

Figura IV: Ciclo intracelular de *L. Monocytogenes*



(1) Adhesión a la célula hospedera y (2) entrada facilitada por las internalinas (InlA, InlB). (3) Lisis de la vacuola fagocítica por acción de listeriolisina (LLO) y fosfolipasas (PlcA y PlcB, ésta última activada por Mpl luego de su secreción). (4) Translocación de derivados hexosa fosfatos de la célula hospedera hacia la bacteria por acción de Hpt, lo cual deriva en una rápida multiplicación bacteriana. (5) Polimerización de actina mediada por ActA y propulsión de la bacteria en el citoplasma. (6) Relajación de las uniones intercelulares por parte de InlC e invasión de pseudópodos. (7) Fagocitosis de éstas estructuras resultando en vacuolas de doble membrana, de las cuales *Listeria* escapa y comienza un nuevo ciclo. (Adaptado de de las Heras y col., 2011).

Características clínicas de la listeriosis en humanos

La listeriosis clínicamente se define cuando el organismo es aislado de la sangre, líquido cerebroespinal, u otros tejidos normalmente estériles (Ramaswamy y col., 2007).

Dos formas básicas de presentación de listeriosis pueden distinguirse: listeriosis perinatal (siempre invasiva) y listeriosis en el paciente adulto (invasiva y no invasiva) (Torres y col., 2005).

A su vez, la listeriosis neonatal tiene dos formas clínicas de presentación: la listeriosis de comienzo temprano (en los dos días posteriores al parto) una enfermedad septicémica con transmisión vertical desde la madre al feto y la enfermedad tardía (cinco o más días del parto) generalmente meningítica. Las formas de transmisión en la enfermedad de inicio tardío son poco conocidas, pudiendo ser el resultado de una transmisión durante el paso por el canal del parto, contacto con la madre durante el periparto o el resultado de una transmisión nosocomial indirecta con casos de enfermedad de comienzo temprano a través de personas o equipo hospitalario (Lepe y Jiménez, 2012).

La listeriosis neonatal de inicio temprano se asocia con aborto espontáneo, nacimiento prematuro, bajo peso al nacer, bronconeumonía, septicemia o muerte del recién nacido por una infección diseminada conocida como granulomatosis infantiséptica, caracterizada por la presencia de microabscesos piogranulomatosos diseminados en hígado, bazo y vellosidades

coriónicas; con mortalidad del 35 al 10%. Los síntomas generalmente incluyen dolor pulmonar, debilitamiento del corazón, deficiencias respiratorias, cianosis, vómito, convulsiones y descarga temprana del meconio. Los síntomas de la madre son similares a los de una influenza con fiebre o infección urinaria en las semanas que preceden al parto (Torres y col., 2005).

En menor frecuencia se observa la listeriosis neonatal tardía (10-15% de los casos perinatales), involucra síndrome febril acompañado por meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía, presumiblemente como resultado de aspiración de exudados maternos contaminados durante el parto, aunque se han reportado casos en donde la enfermedad es adquirida mediante transmisión horizontal por fomites o personal médico en unidades neonatales (Torres y col., 2005).

En el paciente adulto las manifestaciones clínicas de la listeriosis pueden ser divididas en dos grupos: listeriosis invasiva y no invasiva. La listeriosis invasiva se da en los casos en los cuales la infección inicial en el tejido intestinal se disemina hacia otros tejidos estériles, como por ejemplo el útero grávido (placentitis), el sistema nervioso central (meningoencefalitis), la sangre (septicemia), o combinaciones de éstos, y se asocia con individuos inmunocomprometidos. Por otra parte, la listeriosis no invasiva se manifiesta en forma de gastroenteritis, con diarrea, fiebre, dolores de cabeza y mialgia, y está asociada a individuos sanos que consumieron grandes dosis de *L. monocytogenes* (WHO/FAO, 2004).

L. monocytogenes es una de las principales causas de meningitis adquirida. Clínicamente, la meningitis por *Listeria* se presenta con un cuadro de fiebre, cefalea y alteraciones de conciencia. La presentación suele ser brusca o subaguda. Con frecuencia se observan convulsiones, mioclonías y otros signos como ataxia, hemiparesia y parálisis de pares craneales. Estas manifestaciones pueden llegar a presentarse en el 39% de los enfermos y con frecuencia son expresión de romboencefalitis, una alteración del tronco cerebral característica de la infección por *Listeria* que usualmente coexiste con la inflamación meníngea (Julián y col., 2001).

La sepsis primaria causada por *L. monocytogenes* a menudo presenta un curso fulminante, en particular en personas gravemente inmunocomprometidas (Julián y col., 2001), y si el paciente se salva puede sufrir infecciones focales en otros órganos (endocarditis, artritis séptica, osteomielitis, peritonitis, hepatitis, etc.) (Domínguez, 2010).

Las infecciones cutáneas por *L. monocytogenes* son raras. Por lo general se manifiestan en personas saludables en forma de erupciones papulopustulares o vesiculopustulares no dolorosas, no pruríticas, auto limitantes y localizadas. Esta forma cutánea es considerada como una enfermedad profesional, ya que en su mayoría la padecen veterinarios y granjeros que tuvieron contacto con material infectado durante el parto de los animales (Godshall y col., 2013).

En un hospedero con inmunidad normal la *Listeria monocytogenes* produce infección asintomática de la mucosa faríngea y digestiva, y posteriormente puede permanecer como agente colonizador del tracto digestivo (Cisternas y col., 2002).

Cuadro IV: Tipos de infección

Tipo de infección	Período de incubación	Síntomas
Zoonótica	1-2 días	Lesiones cutáneas leves, localizadas y autolimitantes
Neonatal (vertical y horizontal)	1-2 días	Pueden ser graves, resultando en meningitis y muerte
Infección de la madre durante el embarazo por comida contaminada	1 día a varios meses	Parecidos a una gripe leve o asintomática en la madre pero con consecuencias severas para el feto (aborto espontáneo, mortinatos y meningitis)
Listeriosis adquirida por personas no embarazadas a través de alimentos contaminados	1 día a varios meses	Enfermedad asintomática o leve que puede progresar hacia una infección del SNC como la meningitis. Es más común y severa en personas inmunocomprometidas y ancianos
Infección alimentaria por consumo de alimentos con altos niveles de <i>L. Monocytogenes</i> (>10 ⁷ por gramo)	< 24hs	Vómitos y diarrea, a veces puede progresar hacia una septicemia, pero por lo general es autolimitante

Fuente: Adaptado de Bell, 2002

Características clínicas de la listeriosis en los animales

En los animales, las manifestaciones clínicas de la listeriosis incluyen encefalitis, septicemia y aborto, especialmente en ovejas, cabras y vacas. La forma septicémica es relativamente poco común y por lo general, se produce en el recién nacido. Se caracteriza por depresión, inapetencia, fiebre y muerte. La forma encefalítica se denomina a veces “enfermedad en círculo” debido a la tendencia a dar vueltas en una dirección, y es la manifestación más común de la enfermedad en los rumiantes. Los síntomas comprenden depresión, anorexia, caída de la cabeza o torcimiento de la cabeza hacia un lado, parálisis facial unilateral y queratoconjuntivitis bilateral. El aborto se produce, por lo general, en la última etapa (después de 7 meses en vacas y 12 semanas en ovejas). Normalmente sólo tiene lugar una forma clínica de listeriosis en un grupo particular de animales. También se ha descrito la oftalmitis ovina. Asimismo, se asocia la mastitis de rumiantes con la infección por *L. monocytogenes*. Cuando se produce listeriosis en cerdos, la manifestación primaria es septicemia, son menos frecuentes los casos de encefalitis y raros los abortos. Aunque las aves son portadoras subclínicas habituales, se han descrito casos esporádicos de listeriosis, siendo más frecuente la septicemia y mucho menos común la aparición de meningoencefalitis. La listeriosis aviar puede ser el resultado de una infección secundaria en condiciones de enfermedad vírica y salmonelosis (OIE, 2013).

Diagnóstico/ Aislamiento en alimentos

Dado que la siembra directa no suele tener éxito en el aislamiento de este microorganismo de los alimentos, los procedimientos habituales incluyen un enriquecimiento selectivo, seguido de aislamientos en agar selectivo (de Boer, 2009).

Los métodos convencionales para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos que han ganado aceptación con propósitos reglamentarios internacionales son el método de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), el método oficial de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), los Estándares ISO 11290, el método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares franceses (OIE, 2013).

En todos los diferentes medios de enriquecimiento *Listeria monocytogenes* no crece bien si están presentes otras *Listeria* spp. El procedimiento de enriquecimiento para *Listeria monocytogenes* suele incluir un enriquecimiento primario y otro secundario. El caldo para enriquecimiento primario o previo contiene pequeñas cantidades de agentes selectivos para permitir la resucitación de las células dañadas. El medio de enriquecimiento utilizado comúnmente contiene acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximida como agentes selectivos, con fosfato como sistema tampón. Algunos pocos medios contienen cloruro de litio como agente selectivo adicional y piruvato sódico para favorecer la resucitación de las células dañadas (de Boer, 2009).

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, un método puede ser más adecuado que otro. Los métodos de la FDA y de la AOAC pueden utilizarse para el análisis de la leche y los productos lácteos. El método del USDA-FSIS se recomienda para la carne roja y la carne de ave (cruda o lista para comer), los huevos y derivados y las muestras medioambientales (OIE, 2013). La principal diferencia entre el método de la FDA y el del USDA es que éste último utiliza un enriquecimiento de 2 etapas, mientras que el primero lo hace en una etapa (Donnelly y col., 1992).

Los materiales necesarios para el aislamiento de *L. monocytogenes* en productos cárnicos según USDA-FSIS son:

- Caldo University of Vermont modificado (UVM)
- Caldo Fraser (FB)
- Agar Oxford Modificado (MOX)
- Agar sangre de caballo con una sobrecapa de agar (HL o HBO)
- Agar tripticasa soja con 5% de sangre de oveja (TS-SBA)
- Agar tripticasa soja – extracto de levadura (TSA-YE)
- Caldo cerebro, corazón infusión (BHI)
- Kit de pruebas bioquímicas capaz de identificar *Listeria monocytogenes* (ejemplo: Galería API *Listeria*, bioMerieux, MICRO-ID, VITEK 2 Compact o equivalente)
- Test de identificación genética: Kits de hibridación de DNA para *Listeria monocytogenes* (Gene Trak, GenProbe o equivalente)
- Estufa de esterilización
- Autoclave
- Balanza electrónica capaz de pesar 25 g +/- 0.1 g
- Estufa de incubación a 30 °C +/- 2 °C

- Estufa de incubación a 35 °C +/- 2 °C
- Estufa de incubación a 20 °C ó 25 °C +/- 2 °C
- Vórtex
- Stomacher
- Bolsas para stomacher con o sin filtro de capacidad adecuada.
- Ansa de platino o níquel de aproximadamente 3 mm de diámetro ó 10 µl.
- Aguja de inoculación.
- Peachímetro calibrado con exactitud de 0.1 unidad de pH de 20 °C a 25 °C.
- Pipetas graduadas o automáticas de 1 ml y de 100 µl de capacidad nominal.
- Tubos o frascos de capacidad apropiada
- Placas de Petri de vidrio o plástico.
- Cepa de *Listeria monocytogenes* como control positivo: pueden ser ATCC 19111, NCTC 7973 u otro cultivo de *Listeria monocytogenes* validado
- Cepa de *Listeria innocua* como control negativo: puede ser ATCC 33090 u otro cultivo de *Listeria innocua* validado.
- Otras cepas de *Listeria* spp. Como *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii* se pueden requerir como controles para pruebas confirmatorias adicionales.
- Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ó ATCC 4944 y *Rhodococcus equi* ATCC 6939 para realizar el test de CAMP tradicional.

Fuente: ReNaLOA, 2011.

Los pasos a seguir son los siguientes:

1. Preparación de la muestra

Los envases intactos de las muestras deben ser desinfectados en el sitio de la incisión inmediatamente antes de realizar la misma para la toma de muestra. Para la desinfección se puede utilizar: peróxido de hidrógeno al 3 %, etanol al 70 %, o isopropanol al 70 %. Si el envase no parece estar limpio lavar antes de la desinfección con agua y jabón y luego enjuagar.

2. Primer enriquecimiento en caldo UVM

Pesar 25 g de la muestra en una bolsa de stomacher, agregar 225 ml de caldo UVM y homogeneizar durante 2 minutos ± 0.2 minutos en Stomacher. Incubar durante 22 h ± 2 h a 30 °C ± 2° C. Incluir un control positivo y un medio sin inocular como controles, por cada grupo de muestras analizadas.

3. Segundo enriquecimiento en caldo Fraser y siembra en placa directamente del caldo UVM

- 3.1. Transferir 0.1 ml ± 0.02 ml del caldo UVM obtenido en 2 a 10 ml ± 0.5 ml de caldo Fraser (FB) e incubar a 35 °C ± 2 °C durante 26 h ± 2 h.
- 3.2. Sembrar una ansada o una gota de aproximadamente 0.1 ml del caldo UVM obtenido en el punto 2 sobre la superficie del agar MOX y con un ansa estriar desde la zona hisopada el resto del agar para obtener colonias aisladas. Incubar a 35 °C +/- durante 2 °C durante 26 h +/- 2 h.

4. Observación de las placas de agar MOX sembradas directamente con caldo UVM y siembra del caldo Fraser en placas de agar MOX

- 4.1. Examinar las placas del punto 3.2 después de la incubación para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Listeria* spp. Las colonias típicas son pequeñas (aproximadamente 1mm) y rodeadas por un halo de oscurecimiento debido a la hidrólisis de la esculina.
- 4.2. Seleccionar las colonias sospechosas y sembrar en agar HL, como se describe en el punto 6.1.
- 4.3. Si no se evidencian colonias sospechosas, reincubar las placas de agar MOX por 26 h +/- 2 h más.
- 4.4. Examinar después de la incubación los tubos con caldo Fraser para la visualización de un oscurecimiento del caldo debido a la hidrólisis de la esculina.
- 4.5. Si se evidencia oscurecimiento, sembrar asepticamente 0.1 +/- 0.02 ml de caldo Fraser en agar MOX. Estriar o hisopar el 25% - 40% de la superficie del agar y luego con un ansa estriar desde la zona hisopada el resto del agar para obtener colonias aisladas. Incubar a 35 °C +/- 2 °C durante 26 h +/- 2 h.
- 4.6. Si no se evidencia oscurecimiento, reincubar los tubos con caldo Fraser a 35 °C +/- 2 °C durante 26 h +/- 2 h.

5. Observación de las placas de agar MOX y siembra del caldo Fraser de 48 h en placas de agar MOX

- 5.1. Examinar y seleccionar colonias sospechosas de cualquiera de las placas de agar MOX del análisis (ejemplo las placas de MOX estriadas desde el caldo Fraser de 26 h +/- 2 h y/o UVM).
- 5.2. Re-examinar el caldo Fraser para evidenciar la presencia de oscurecimiento después de 48 h +/- 2 h de incubación.
- 5.3. Si evidencia oscurecimiento, hisopar, estriar e incubar en placas de agar MOX.
- 5.4. Si no se evidencia oscurecimiento y no se observan colonias sospechosas en las placas de agar MOX o HL, la muestra se considera negativa para *Listeria monocytogenes*.

6. Aislamiento y purificación

- 6.1. Seleccionar las colonias sospechosas en las placas de agar MOX y con un ansa tocar como mínimo 20 colonias (si hay disponibles), y estriar por agotamiento en superficie en placas de agar HL para obtención de colonias aisladas. Incubar las placas a 35 °C +/- 2 °C durante 22 h +/- 4 h.
- 6.2. Después de la incubación examinar las placas de agar HL a contra luz para observar colonias translúcidas rodeadas por un pequeño halo de β -hemólisis.
- 6.3. Si al menos una colonia sospechosa está claramente aislada, proceder con el test de confirmación (Conservar las placas a temperatura ambiente o en heladera hasta completar el test de confirmación).
- 6.4. Si hay colonias sospechosas con β -hemólisis pero no están aisladas, reaislar las colonias en un nuevo agar HL.
- 6.5. Si no se evidencian colonias sospechosas en ninguna de las placas de agar HL, la muestra se considera negativa para *Listeria monocytogenes*.

7. Confirmación y otros procedimientos de identificación

La identificación y confirmación de *Listeria monocytogenes* consiste en pruebas de confirmación preliminar, pruebas bioquímicas, test de CAMP y en algunas situaciones se requiere de tests genéticos

- 7.1. Test de confirmación preliminar: a partir de una colonia aislada en agar HL inocular caldo BHI y, opcionalmente, inocular una placa fresca de agar HL para confirmar la pureza de la colonia. A partir de esa misma colonia inocular los medios para realizar las pruebas bioquímicas (agar HL, TSA-YE ó TS-SBA o equivalentes). Como mínimo una colonia debe ser confirmada. Si la colonia sospechosa seleccionada en el agar HL no es confirmada como *L. monocytogenes*, se debe realizar la confirmación a otras colonias, si hay disponibles, hasta que al menos 3 colonias sospechosas den la confirmación negativa.
- 7.2. Prueba de la movilidad (opcional): inocular el caldo BHI, incubar 16 h a 18 °C – 25 °C. Si no se evidencia crecimiento, reincubar hasta que se observe crecimiento o hasta un máximo de 48 h. Luego de la incubación, depositar una gota del cultivo entre porta y cubre objeto bien limpio, y examinar en el microscopio. *Listeria* spp. Aparece como bacilos cortos, delgados y con movimientos característicos de “tumbos” (tumbling).
- 7.3. Coloración de Gram: realizar la coloración de Gram. *Listeria* spp. Se presenta como bacilos Gram positivos cortos y delgados.
- 7.4. Prueba de catalasa: tomar una colonia aislada y suspender en una gota de solución de peróxido de hidrógeno en un portaobjeto. *Listeria* spp. da una reacción positiva que se evidencia por la formación inmediata de burbujas de gas.

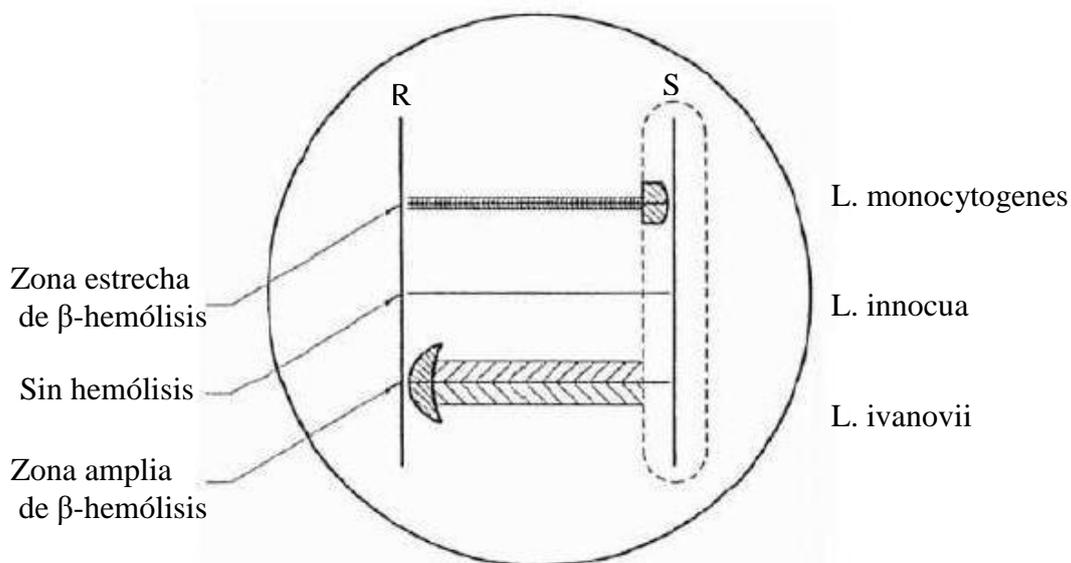
Nota: Si la morfología y la movilidad no es característica de *Listeria* spp. y el cultivo es puro, informar *Listeria monocytogenes* negativo. Si la morfología y la movilidad es característica de *Listeria* spp. y el cultivo es puro, continuar con las pruebas bioquímicas para la confirmación de *Listeria monocytogenes*.

- 7.5. Pruebas bioquímicas: a partir de colonias aisladas en agar HL, TSA-YE o TS-SBA o equivalentes, realizar la confirmación bioquímica mediante la galería de API *Listeria* – bioMérieux, MICRO-ID, VITEK 2 Compact o equivalente (siguiendo las instrucciones del fabricante) o mediante pruebas bioquímicas en tubo.
- 7.6. Prueba de CAMP (Figura V)
 - 7.6.1. En una placa de agar TS-SBA estriar en forma paralela una línea simple de *S. aureus* ATCC 25923 ó ATCC 4944 y otra línea simple de *Rhodococcus equi* ATCC 6939, separados entre si 3-4 cm. Utilizar un ansa o aguja de inoculación.
 - 7.6.2. Estriar los cultivos test en una línea simple y perpendicular, entre las dos líneas de cultivos de referencia. Las líneas de cultivo test deben estar separadas de las de referencia 2-4 mm. Durante el estriado, las líneas test y referencia no se deben tocar para evitar contaminación cruzada.
 - 7.6.3. Simultáneamente estriar cultivos controles de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. ivanovii*.
 - 7.6.4. Incubar 24 h +/- 2 h a 35 °C.
 - 7.6.5. Se considera reacción positiva una zona acrecentada de β -hemólisis en la intersección de los cultivos test y los cultivos de *S. aureus* y *R. equi*.
 - 7.6.6. Una reacción positiva para *R. equi* se ve como una amplia zona (5 a 10 mm) en forma de “cabeza de flecha” de hemólisis. La reacción es negativa si se presenta

como una pequeña zona (alrededor de 1 mm) de hemólisis débil en la intersección del cultivo test con la zona de difusión de *R. equi*.

7.6.7. Una reacción positiva para *S. aureus* se ve como una pequeña zona de hemólisis acrecentada, que se extiende alrededor de 3 a 4 mm del cultivo test y dentro de la zona de hemólisis débil debida al crecimiento del cultivo de *S. aureus*. No ocurre una zona grande de β -hemólisis en la proximidad de las áreas entre *S. aureus* y *L. monocytogenes*.

Figura V: Prueba de CAMP



Fuente: Adaptado de ReNaLOA, 2011.

8. Interpretación bioquímica (Cuadro V)

Especie	Hemólisis	Producción de ácido		Test de CAMP	
		ramnosa	xilosa	<i>S. aureus</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> sub. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> sub. <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: reacción variable

(+): reacción positiva débil

+: > del 90% reacciones positivas

-: reacción negativa

Nota: existen algunas cepas raras de *L. monocytogenes* que no dan β -hemólisis y dan reacción de CAMP negativa

9. Test de identificación genética

Los test de identificación genética pueden ser utilizados como test confirmatorios para todas las cepas de *Listeria monocytogenes* identificadas por pruebas bioquímicas. Sin embargo, pueden ser requeridos para identificar cepas atípicas sospechosas de ser *L. monocytogenes*. En algunos casos no se pueden diferenciar las cepas de *L. monocytogenes* de las cepas de *L. innocua* por pruebas fenotípicas, en particular para *L. monocytogenes* β -hemolíticas ramnosa negativa y fosfolipasa C negativa. En otros casos, una *L. monocytogenes* débilmente hemolítica puede ser confundida como *L. innocua* (además existen las cepas de *L. innocua* β -hemolíticas).

10. Expresión de los resultados

De acuerdo a los resultados de 8 y 9 (en caso de realizarse) indicar presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en la cantidad de muestra analizada (por gramos o mililitros para muestras líquidas).

11. Control positivo

Junto con la muestra realizar un control positivo con un inóculo de una cepa de *Listeria monocytogenes* de referencia, y proceder de la misma manera que la muestra para demostrar que el cultivo positivo es recuperado.

Fuente: ReNaLOA, 2011.

Métodos rápidos

La mayor limitación de los métodos de cultivo tradicionales es que necesitan mucho tiempo y pueden tardar varios días en obtener un resultado. Dado la necesidad de detectar con celeridad patógenos alimentarios es que se han desarrollado varios métodos rápidos para su diagnóstico. Las principales categorías a las que pertenecen estos métodos son la de los inmunológicos o basados en pruebas con anticuerpos, los cromogénicos, y los métodos moleculares o genéticos, como los que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (de Boer, 2009).

Métodos inmunológicos

Los métodos inmunológicos se basan en la reacción específica entre un anticuerpo y el antígeno asociado al microorganismo a analizar. La elección del tipo de antígeno y el anticuerpo es crítica, ya que esta elección afectara a la especificidad del método. Estos análisis son fáciles de realizar y tienen el potencial de poder analizar muchas muestras rápidamente. Dentro de estos métodos tenemos varios kits comerciales para la detección de *Listeria* basados en pruebas de aglutinación, ELISA, separación inmunomagnética y otros inmunoensayos (de Boer, 2009).

En nuestro medio los métodos más utilizados por frigoríficos y chacinerías tanto para muestras de alimentos como ambientales son el test Reveal[®] 2.0 y si éste da positivo se continúa con una siembra en CHROMagar[™] *Listeria*, un medio cromogénico en placas de petri.

El test Reveal[®] 2.0 es un test inmunodiagnóstico validado por el instituto de investigación de la AOAC que facilita la rápida detección de *Listeria* spp. en muestras de alimentos y ambiente previamente incubadas en un medio de enriquecimiento (LESS, *Listeria* Enrichment Single Step). Luego del enriquecimiento, se extraen 2 ml en un tubo de ensayo y se lo lleva a baño de maría a 80 °C durante 20 minutos, se lo deja enfriar a temperatura ambiente y luego se extrae una porción del mismo (200 µl) que es introducida en las copas para el test. Por último se introduce el dispositivo Reveal en las copas, se lo incuba a temperatura ambiente durante 20 minutos y se procede a la lectura. Una línea en la zona de control y otra en la zona de ensayo es considerado positivo, una línea solamente en la zona de control es considerado negativo y si no se visualizan líneas la prueba se considera inválida (Neogen, 2013).

Este test está basado en la reacción y migración de complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). Cuando el dispositivo Reveal toma contacto con la muestra en las copas, la misma atraviesa una zona reactiva que contiene anticuerpos conjugados con partículas de oro coloidal específicos contra *Listeria*. Si hay antígenos presentes en la muestra, se unirán a éstos anticuerpos formando un complejo Ag-Ac. Estos complejos abandonan la zona reactiva y viajan a través de una membrana de nitrocelulosa que contiene anti-anticuerpos contra *Listeria*, los cuales capturan los complejos formados previamente, revelando una línea visible (Alles y col., 2012).

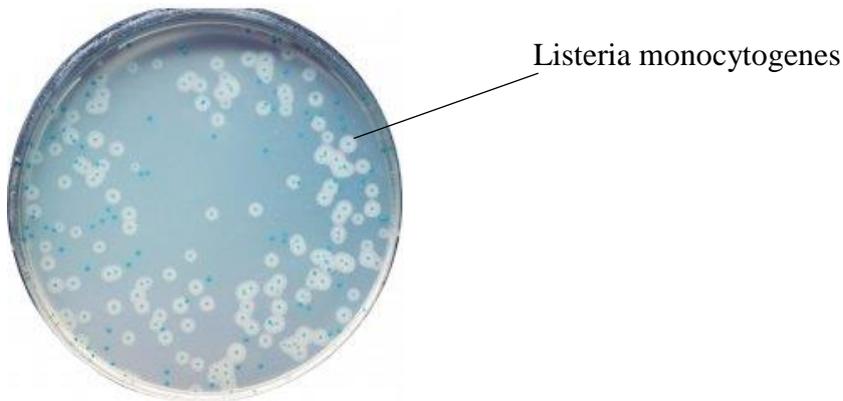
La zona reactiva también contiene un antígeno conjugado con oro exclusivo de *Listeria* (antígeno control). Este antígeno migra a través de la membrana hasta la zona de control, donde es capturado por anticuerpos específicos contra el mismo, lo cual forma una línea visible (línea de control). Esta línea de control se forma tanto en presencia como en ausencia de antígenos de *Listeria*, lo que asegura el correcto funcionamiento del test (Alles y col., 2012).

Métodos cromogénicos

CHROMagar[™] *Listeria* es un método cromogénico para la detección de *Listeria* tanto en alimentos como en ambiente. Está validado por la AFNOR (Association française de Normalisation) y cuenta de 3 pasos: 1) enriquecimiento en medio caldo Frazer durante 24 hs, 2) aislamiento en CHROMagar[™] *Listeria* y 3) confirmación de la especie *Listeria* monocytogenes con CHROMagar[™] Identification *Listeria* ó con las pruebas convencionales descritas en los métodos normalizados por CEN (European Committee for Standardization) o ISO (International Organization for Standardization) (CHROMagar, 2013).

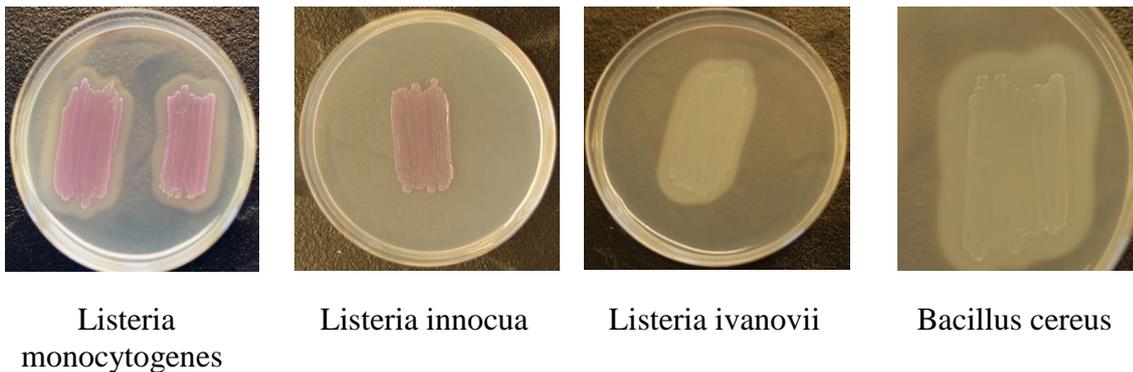
Luego de la incubación a 37 °C (24 hs para muestras de alimentos y 48 hs para muestras ambientales) en CHROMagar[™] *Listeria* se visualizan las colonias típicas de *L. monocytogenes* (azules, diámetro inferior a 3mm, halo uniforme y blanco) (Figura VI), también pueden ser visualizadas colonias de *L. innocua* (azules sin halo), mientras que colonias de *E. faecalis* y *E. coli* son inhibidas (CHROMagar, 2014a). Las colonias típicas de *L. monocytogenes* deberán confirmarse mediante siembra directa e incubación durante 18 a 24 hs a 37 °C en CHROMagar[™] Identification *Listeria*, las mismas se visualizarán como colonias malva rodeadas de un halo blanco en caso de ser positivas (Figura VII). Otras colonias que se pueden visualizar son de *L. ivanovii* (incolores rodeadas de un halo blanco), *L. innocua* (malva sin halo), *L. seeligeri* (incolores sin halo) y *B. cereus* (incolores con borde irregular y con halo intenso) (CHROMagar, 2014b).

Figura VI: Aspecto típico de las colonias en CHROMagar Listeria



Fuente: CHROMagar, 2013.

Figura VII: Aspecto típico de las colonias en CHROMagar para identificación de Listeria



Fuente: CHROMagar, 2014a.

Métodos moleculares

La base de éstas pruebas reside en una secuencia de un ácido nucleico (ADN o ARN), específica del microorganismo a analizar. Los genes asociados con la virulencia se utilizan a menudo para identificar a los patógenos (de Boer, 2009). En el caso de *L. monocytogenes* las secuencias diana nuevas, a efectos de diagnóstico, incluyen el gen de la metaloproteasa, el gen *prfA* y el gen *ssrA* (OIE, 2013). Los sistemas comerciales de análisis para *L. monocytogenes* disponibles en el mercado se basan en la hibridación del ácido nucleico, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y PCR en tiempo real (de Boer, 2009).

Tratamiento en humanos

Actualmente, la administración de penicilina o ampicilina, en monoterapia o combinadas con gentamicina, es el tratamiento de elección frente a las infecciones por *L. monocytogenes*. Ésta bacteria posee una resistencia natural a las cefalosporinas. Se puede utilizar eritromicina en pacientes alérgicos a penicilina (Murray, 2006).

El tratamiento de los neonatos puede limitar las secuelas y el tratamiento de la bacteriemia materna durante la gestación puede evitar la infección neonatal (Cisternas y col., 2002).

En infecciones graves se recomienda administrar como fármacos iniciales ampicilina y un aminoglucósido (sulfato de gentamicina). Después de que se manifiesta la respuesta clínica, o en infecciones menos graves en hospedadores inmunocompetentes, se puede administrar ampicilina sola. Si el paciente es alérgico a la penicilina, otro fármaco al que cabe recurrir es trimetoprim-sulfametoxazol (Pickering, 2005), sin embargo, se han observado resistencias a trimetoprim y las tetraciclinas (Murray, 2006).

En el caso de infecciones invasoras sin meningitis acompañante, es satisfactorio el tratamiento durante 10 a 14 días. Si surge meningitis por el microorganismo, casi todos los expertos recomiendan 14 a 21 días de tratamiento. Se necesitan ciclos más largos (4 a 6 semanas) en pacientes muy graves o que padezcan endocarditis o romboencefalitis (Pickering, 2005).

Recomendaciones generales para la prevención y control de *Listeria monocytogenes*

Las siguientes estrategias pueden ayudar a prevenir o reducir el riesgo de listeriosis transmitida por alimentos, al igual que otras enfermedades transmitidas por alimentos.

- Adquirir comidas refrigeradas que se encuentren congeladas en estado sólido.
- Comprar productos cuyos envases no se encuentren rotos, ni deformados.
- Descartar cajas hinchadas, enmohecidas, o dañadas.
- Colocar las carnes separadas en recipientes plásticos para prevenir la contaminación.
- No comprar carnes cocidas que estén refrigeradas junto con las carnes crudas.
- Solo ingerir miel, leche y sus derivados que hayan sido pasteurizados.
- Descartar los quesos blandos (brie, feta, Camembert y queso azul).
- Chequear y controlar la fecha de vencimiento indicada en los envases de carnes, huevos, etc.
- Chequear que la cáscara de los huevos esté en perfectas condiciones.
- Envasar verduras similares juntas.
- No dejar comida en vehículos expuestos a altas temperaturas o directamente a la luz solar.
- Los refrigeradores deben mantenerse a una temperatura de 4 °C y los freezers a menos de 0 °C. Permitir la correcta circulación de aire en el refrigerador estableciendo espacios entre los alimentos.
- Rotular y fechar los alimentos cocidos almacenados en el freezer
- Las carnes descongeladas en el microondas deben cocinarse inmediatamente, las que se descongelaron naturalmente deben cocinarse en no más de 24 horas.
- El lavado de manos es la mejor defensa para prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos. Enseñar a quienes manipulan alimentos a lavarse adecuadamente las manos y a proteger las heridas con guantes.

(Acuña y col., 2002)

Toda la población debería seguir éstas recomendaciones, pero especialmente los inmunocomprometidos y las embarazadas, quienes además deberían tomar precauciones adicionales como ser:

- No consumir quesos duros o preparados, en rebanadas o para untar, ni queso crema, queso de granja (cotage) o yogur.
- Cocinar sobrantes de alimentos o alimentos listos para consumo (salchichas) hasta que comiencen a emitir vapor, antes de consumirlos.
- No consumir alimentos en expendios automáticos de productos de salchichonería (como ensaladas preparadas, carnes o quesos), o bien calentarlos y recalentarlos hasta que emitan vapor antes de consumirlos.
- No consumir patés refrigerados ni carnes para untar, o bien calentarlos hasta que generen vapor; será mejor no consumir paté enlatado o al menudeo ni carne para untar.

(Pickering, 2005)

Para el control de la listeriosis se requieren acciones tanto de las agencias de salud pública como de las industrias alimentarias (Allerberger y Wagner, 2010).

No solamente los consumidores deben de tomar medidas para la prevención de ésta enfermedad. El pilar fundamental de la prevención es el establecimiento de políticas tendientes a prevenir la contaminación, y el desarrollo de *L. monocytogenes* en los distintos productos de la cadena alimentaria. Es así que las industrias y empresas alimentarias deben orientar su política preventiva a los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (SSOP), Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) (Cecchini, 2008).

Por su parte, las autoridades sanitarias cumplen un rol fundamental en el control de la listeriosis a través de los programas de vigilancia epidemiológica, así como la detección rápida de los brotes, y la caracterización de los cultivos de las muestras clínicas, alimentarias y ambientales (Lundén y col., 2004).

Otra medida lógica a la cual recurrir para la prevención y control de *L. monocytogenes* sería la vacunación, pero ésta actualmente no es viable, ya que el desarrollo de vacunas efectivas contra éste microorganismo es muy difícil dado sus características de patógeno intracelular, y la necesidad de la participación de linfocitos T efectores para desencadenar una respuesta inmune efectiva. Se han estudiado vacunas experimentales utilizando animales de laboratorio con el fin de conferir protección frente a la infección por *L. monocytogenes* mediante una serie de diferentes aproximaciones, pero estas todavía se encuentran lejos de estar disponibles para ser utilizadas en el hombre o en los animales domésticos (OIE 2013).

Incidencia a nivel mundial

La listeriosis tanto en el hombre como en los animales está ampliamente distribuida, habiendo sido descrita en Africa, América, Asia, Australia y Europa (Manzullo, 1980).

La listeriosis es una enfermedad rara, de la que se declaran anualmente en el mundo varios miles de casos, que solo representan una fracción de los diagnosticados, que, a su vez, son una mínima parte de los casos reales. La incidencia, referida al millón de habitantes en Europa, y en América del Norte es de 2 a 7 (Domínguez, 2010).

La incidencia depende mucho de cómo y dónde se hizo la declaración, ya que difiere si se hace en la comunidad o en los hospitales, así como de la cultura sanitaria del país y su población, de la gravedad de cada caso, del criterio diagnóstico, de si se hace por vigilancia o

por método centinela, etc. La baja incidencia de casos reales que al parecer tienen los países subdesarrollados se achaca al escaso desarrollo de la industria del frío y probablemente a no disponer de técnicas de diagnóstico etiológico (Domínguez, 2010).

Canadá

El primer caso confirmado de infección por *L. monocytogenes* en Canadá fue reportado en 1951 en una mujer embarazada la cual había residido en el país por un año luego de emigrar de Rusia (Farber y Losos, 1988).

Entre 1951 y enero de 1972 se declararon un total de 101 casos, de los que 80 fueron declarados en 9 de las 10 provincias de Canadá al Laboratorio Central para el Control de Enfermedades de Ottawa, y 21 casos más fueron notificados por Sepp y Roy en el área metropolitana de Toronto. De los 101 casos declarados, 48 fueron varones y 38 mujeres, siendo la letalidad del 35% y 32%, respectivamente (Bowmer y col., 1973).

Hasta 1984 se produjeron un total de 381 casos de listeriosis, siendo todos ellos esporádicos, excepto 41 de ellos en la región de Nueva Escocia, los cuales fueron de origen alimentario por consumo de repollo crudo. Entre 1971 y 1984, 28 muertes fueron atribuidas a listeriosis. En 1988 el Departamento Nacional de Salud comenzó la planificación de un programa de vigilancia epidemiológica para las infecciones por *L. monocytogenes* para determinar la importancia de la contaminación de los alimentos (Farber y Losos, 1988).

En Canadá, entre 1995 y 1999 el programa de vigilancia pasiva contra la listeriosis detectó entre 25 a 51 casos anuales, Sin embargo, programas de vigilancia pasiva como éste pueden tener casos infradeclarados en comparación con programas de vigilancia activa implementados en otros países (Bortolussi, 2008).

En el 2001 fue creado el Servicio Canadiense de Referencia para la Listeriosis (Canadian Listeriosis Reference Service), el cual tiene como objetivo la investigación de casos de listeriosis y el desarrollo de una base de datos epidemiológica de aislamientos moleculares de *L. monocytogenes*, como fuente para la investigación de brotes (Bortolussi, 2008).

Desde 1990 al 2000, todas las formas de listeriosis eran declarables, a partir del 2007 solamente las formas invasivas requieren notificación (PHAC, 2014).

Estados Unidos

En Estados Unidos en 1996 se creó la Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet). Se trata de un sistema de vigilancia activa, de base poblacional y de confirmación por medio de laboratorio de los casos de los siguientes agentes infecciosos: *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Listeria*, *Salmonella*, *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) O157 y no-O157, *Shigella*, *Vibrio* y *Yersinia*. Este sistema cubre 10 estados y 15% de la población del país (CDC, 2013).

Según FoodNet entre 1996 y 2005 se produjeron 552 muertes por infecciones bacterianas, de las cuales el 30% fueron causadas por *L. monocytogenes*, ubicándose ésta como la segunda causa de muerte más importante por infecciones bacterianas, solamente detrás de *Salmonella* (responsable del 39% de las muertes) (Barton y col., 2011).

Para el año 2001 la incidencia de listeriosis había descendido en un 37% en comparación con el período 1996-1998, lo que pone en evidencia la utilidad de ésta red para el control de la listeriosis. Sin embargo el brote mas grande de listeriosis en la historia de Estado Unidos ocurrió en el 2011, con 147 enfermos, 33 muertos, y un aborto a lo largo de 28 estados; el brote fue asociado al consumo de melón proveniente de una única granja (CDC, 2014).

El último reporte preliminar de FoodNet indica que la incidencia de listeriosis en 2012 es la misma que para el período 2006-2008 (0.25), con un total de 121 casos cada 100.000 habitantes , ubicándose en noveno lugar detrás de Salmonella (7.800;16.42), Campylobacter (6.793;14.30), Shigella (2.138;4.50), Cryptosporidium (1.234;2.60), STEC no-O157 (551;1.16), STEC O157 (531;1.12), Vibrio (193;0.41), y Yersinia (155;0.33). Sin embargo, en cuanto a los porcentajes de hospitalizaciones y muertes, listeria ocupa el primer lugar con 96% y 10.74 % respectivamente. Estos datos evidencian la relativa rareza de la enfermedad y a su vez, lo extremadamente grave que puede ser la misma (CDC, 2013).

Europa

La notificación de Listeria en humanos, animales y alimentos se realiza de manera desigual en los países que integran la Unión Europea. Así los primeros casos de listeriosis humana se notificaron en Austria en 1947, los primeros casos en animales en Noruega en 1965 y los primeros casos en alimentos en Italia en 1962 (Cuadro VI).

Cuadro VI: Notificación de Listeria en humanos, animales y alimentos en la Unión Europea, 2007

País	Listeria en humanos	Listeria en animales	Listeria en alimentos
Austria	1947 ¹	No	1975
Bélgica	<1999 ²	1998	2004
Chipre	No	-	-
República Checa	Si	No	-
Dinamarca	1993	No	-
Estonia	2003	2000	2000
Finlandia	1995	1995 ³	No ⁴
Francia	Si	-	-
Alemania	Si	Si	-
Grecia	Si	1980	-
Hungría	1998	No	2003

Irlanda	2004	-	No notificable ⁵
Italia	1990	No	1962
Letonia	1990	Si	2003
Lituania	1998	> 30 años	-
Luxemburgo	-	-	-
Malta	Si	-	-
Noruega	1975	1965	No
Polonia	Si	-	-
Portugal	Si	No	-
Eslovaquia	Si	Si	2000
Eslovenia	1977	1991 ⁶	2003
España	1982	1994	1994
Suecia	> 30 años ⁷	Si	No
Holanda	No	Si	Si
Reino Unido	No	No	No

(1) En Austria, notificable desde el 14 de Abril de 1913, reintroducida el 12 de Junio de 1947, adaptada el 28 de Abril de 1950. (2) En Bélgica, sólo en la Flemish Community. (3) En Finlandia, notificable también antes de 1995, pero la legislación cambió en 1995. (4) En Finlandia, el operador del negocio alimentario debe de notificar a la autoridad competente, pero no hay un sistema de notificación central. (5) En Irlanda, el operador del negocio alimentario debe dar notificación a la autoridad competente de acuerdo al SI 154/2004-European Communities (Monitoring of Zoonoses) Regulations 2004. (7) En Suecia, solamente los casos clínicos son notificables.

Fuente: EFSA, 2009.

En varios países de Europa la incidencia de casos de listeriosis ha ido en aumento o se ha mantenido relativamente alta desde el año 2000 (Goulet y col., 2008), esto puede estar asociado a varios factores, como ser: cambios en las poblaciones susceptibles, mejoras en los procedimientos diagnósticos, alteraciones en los hábitos alimenticios, cambios en la legislación, incrementos en la temperatura ambiente o alteraciones en las formulaciones de los alimentos y condiciones de almacenamiento como la temperatura de refrigeración o la vida útil (Denny y McLauchlin, 2008).

Cuadro VII: Número de casos confirmados e incidencia de listeriosis humana cada 100.000 habitantes en Unión Europea, período 2002-2012

	2002	2003	2004	2004	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Casos	909	1070	1264	1427	1583	1554	1381	1645	1601	1476	1642
Incidencia	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.36	0.35	0.32	0.41

Fuente: Adaptado de Denny y McLauchlin, 2008, EFSA 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014.

Para el período 2002-2011 la incidencia de listeriosis puede describirse como estabilizada, con alrededor de 0.3 casos cada 100.000 habitantes, salvo en el año 2003 en el cual descendió a 0.2. En el año 2012 se observa un incremento del 10.5% en el número de casos en comparación a 2011.

De todas las enfermedades zoonóticas bajo vigilancia en la Unión Europea en 2012, la listeriosis causó los cuadros más severos, con 91.6% de los casos hospitalizados y 198 casos fatales (tasa de fatalidad: 17.8%) (EFSA, 2012).

Con respecto a la declaración de brotes de listeriosis, entre 2008 y 2012 se notificaron 15, con un total de 146 casos relacionados, de los cuales 127 (87%) requirieron hospitalización y 28 (19%) fallecieron. Se destacan los años 2009 y 2011 con el 100% de los casos hospitalizados (Cuadro VIII).

Cuadro VIII: Brotes con fuerte evidencia o confirmados de *Listeria monocytogenes* en la Unión Europea, período 2008-2012

Año	Brotes	Casos*	Hospitalizaciones*	Muertes*	Alimentos implicados
2008	1	14	7	0	Productos de catering
2009	3	40	40	11	Queso y carne de cerdo
2010	3	26	22	4	Pescado, carne mezclada, alimento sin especificar
2011	3	11	11	4	Queso casero, comida mezclada y productos de panadería
2012	5	55	47	9	Sándwiches, pastel de cerdo, carne bovina y

					subproductos, quesos, embutidos y otros alimentos como gelatina de carne
--	--	--	--	--	---

*: Datos en base a brotes

Fuente: Adaptado de EFSA 2010, 2011, 2012, 2013, 2014.

Con el fin de alcanzar una mayor detección de brotes y un análisis de la tendencia de la listeriosis en 2002 se creó en Europa un grupo de expertos para el estudio de las infecciones por *L. monocytogenes*. El mismo estaba integrado por 17 países, de los cuales 10 contaban con un sistema de notificación obligatoria: Bélgica, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Islandia, Italia, Noruega, Suecia y Suiza. De los 7 países restantes, 6 notificaban de forma voluntaria: Grecia, Irlanda, Inglaterra, Gales, Escocia y España. Únicamente Portugal carecía de un sistema de vigilancia epidemiológica nacional (de Valk y col., 2005).

En el 2003 el grupo de expertos publicó las siguientes recomendaciones:

- Crear una red europea de vigilancia epidemiológica de infecciones por listeria (Listernet) (la cual todavía no ha entrado en efecto)
- Objetivos de Listernet:
 1. Detectar rápidamente los brotes internacionales
 2. Notificar y aportar información sobre los brotes nacionales (de un país) o de los brotes potencialmente internacionales
 3. Colaborar en la investigación de brotes internacionales
 4. Proporcionar los datos comparativos para monitorizar tendencias de importancia internacional en: Incidencia de la listeriosis, características de los casos y características de los serotipos
 5. Contribuir a la consolidación de la vigilancia nacional de los países participantes
 6. Contribuir a estimar la mortalidad y la morbilidad de la listeriosis
 7. Contribuir a la monitorización y evaluación de las medidas preventivas y de control y comparar las tendencias entre los países participantes
- Desarrollar una base de datos europea que utilice una definición común de caso, que contenga unos datos mínimos y que incluya resultados armonizados por cultivo en electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE)
- Reforzar los sistemas nacionales de vigilancia y adaptarlos para su participación gradual en Listernet
- La transmisión de los perfiles de PFGE o la transmisión de las cepas
- Focalización en la listeriosis humana
- Componentes del proyecto Listernet:
 1. Establecer procedimientos estándares de laboratorio para el serotipado y la PFGE y una garantía de la calidad externa
 2. Detección de brotes
 3. Investigación de brotes
 4. Principios de colaboración

5. Investigación epidemiológica de la resistencia a antibióticos

- Puesta en marcha del proyecto para la UE

(de Valk y col., 2003)

Actualmente la notificación de listeriosis humana es obligatoria en la mayoría de los Estados Miembros (EMs), solamente en Bélgica, España y Reino Unido la notificación está basada en un sistema voluntario. Todavía no existe un sistema de vigilancia en Portugal. Los sistemas de vigilancia de cada EM cubren a todo el territorio nacional, excepto en el caso de España, en donde la cobertura estimada es del 25%. El diagnóstico de listeriosis humana generalmente se hace a partir de cultivos de sangre, líquido cerebro-espinal o hisopados vaginales (EFSA, 2012).

En lo que respecta a los alimentos, *Listeria* es de notificación obligatoria en Austria, Bélgica, Estonia, Francia, Alemania, Hungría, Italia, Letonia, Países Bajos, Eslovaquia, Eslovenia y España, sin embargo otros EMs también registran datos. En Enero de 2006 entró en vigencia el Reglamento (CE) No 2073/2005 de la Comisión, del 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, el cual establece los criterios sobre inocuidad alimentaria para *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. La vigilancia en estos alimentos se hace en la mayoría de los EMs (EFSA, 2012).

El panorama en la región

En Argentina, se han documentado numerosos abortos naturales por *Listeria* incluso mucho antes de que se conociera su transmisión por alimentos. Sin embargo, no se han descrito ni brotes alimentarios ni casos esporádicos de listeriosis en los que se haya identificado el alimento, en los últimos 30 años. La enfermedad no es de notificación obligatoria (Michanie, 2004).

El Código Alimentario Argentino (C.A.A) exige en quesos de mediana, alta y muy alta humedad ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25g de muestra. En el caso de los productos cárnicos y afines el C.A.A exige ausencia de *L. monocytogenes* en 25g de muestra para las salazones cocidas y crudas, así como también para los chacinados embutidos secos y cocidos, y los chacinados no embutidos cocidos. No están considerados dentro de ésta exigencia los chacinados embutidos frescos y los chacinados no embutidos frescos (ANMAT, 2014).

En Brasil, no se describen brotes por *L. monocytogenes*, lo que se ha atribuido a la notificación incompleta y subdiagnóstico de este agente en los alimentos. Sin embargo se han descrito varios casos de listeriosis pero ninguno relacionado con alimentos (de Souza, 2014).

Brasil cuenta con varias leyes que tratan los procesos de control de calidad para garantizar la seguridad del producto. Dentro de éste marco legal encontramos la Resolución – RDC n° 12, de 2 de Enero de 2001 que aprueba el Reglamento Técnico sobre Patrones Microbiológicos para Alimentos; y la Instrucción Normativa n° 9 de 9 de abril de 2009. La primera tiene como objetivo regular todos los productos que necesitan la investigación de *Listeria*, exigiendo la ausencia de la misma en 25 g o ml del producto. La segunda trata sobre los procedimientos de control de *L. monocytogenes* en productos de origen animal prontos para el consumo, y tiene como objetivo garantizar el control y la seguridad de dichos productos y de la totalidad de alimentos de origen animal que se ofrecen a la venta en condiciones para su consumo inmediato y sin más tratamiento (de Souza, 2014).

En Chile sólo a partir del año 2008 ha habido informes de casos de listeriosis transmitida a través de los alimentos, si bien ya había sido diagnosticada su presencia en casos clínicos. Esto se debe a que en ese año el país sufrió un grave brote de listeriosis por consumo de quesos blandos, en dicho brote se identificaron 119 casos y 5 muertes (Schöbitz y col., 2009).

La escasa información sobre la prevalencia de este patógeno a nivel de la industria de alimentos en Chile se debe en parte a que la detección en alimentos no estaba incluida en el Reglamento Sanitario de Alimentos, solamente se controlaban los alimentos de exportación (Schöbitz y col., 2009). Ésta situación cambia a partir de 2009 a través del decreto n° 63, artículo 1° del Ministerio de Salud que modifica el Reglamento Sanitario de los Alimentos incorporando muestreos de *L. monocytogenes* a los alimentos listos para el consumo (MinSal, 2009). La vigilancia epidemiológica en Chile de esta patología es de laboratorio, a través del Instituto de Salud Pública, no siendo obligatoria la notificación de casos clínicos (Alcayaga y Hott, 2008).

En nuestro país la vigilancia epidemiológica de las ETA se realizaba a través del Sistema VETA (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica de las ETA). El mismo era un sistema de información simple, oportuno, continuo, de las enfermedades adquiridas por el consumo de alimentos y/o agua, que incluía la investigación de los factores determinantes y los agentes causales de la entidad, así como el establecimiento del diagnóstico de la situación, permitiendo la formulación de estrategias de acción para la prevención y control (Acuña y col., 2002).

El Sistema VETA en Uruguay se inició en 1995 involucrando diferentes actores: Ministerio de Salud Pública (MSP), Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, Universidad de la República, a través de distintas Facultades: Medicina, Química, Agronomía, Veterinaria, Ciencias; Laboratorio Tecnológico del Uruguay; Obras Sanitarias del Estado, responsable de la prestación del servicio de agua potable en toda la República y de alcantarillado (en toda la República, exceptuando Montevideo) (Acuña y col., 2002). Sin embargo, éste sistema no registró ningún caso esporádico o brote de listeriosis en nuestro territorio vinculado a los alimentos, y actualmente se encuentra en desuso. La Unidad de Vigilancia en Salud Pública (UVISAP) del MSP es quien lleva los registros sobre listeriosis en nuestro territorio, pero la misma no cuenta con una base de datos de acceso público a dichos registros.

Normativa existente en nuestro país

La listeriosis en Uruguay está contenida dentro del grupo A de enfermedades y eventos de declaración obligatoria del Código Nacional sobre Enfermedades y Eventos Sanitarios de Notificación Obligatoria. Éste grupo está conformado por una serie de enfermedades, dentro de las cuales encontramos a las enfermedades transmitidas por los alimentos, cuya notificación debe ser de forma inmediata en el día por la vía de comunicación más rápida disponible (Uruguay, 2004). Dicha notificación deberá hacerse a la UVISAP, para lo cual existe un protocolo a seguir en la Guía ETA del MSP (MSP, 2006).

La normativa alimentaria uruguaya está basada en el Reglamento Bromatológico Nacional (R.B.N), Decreto N° 315/994 del 05/07/1994. Éste documento originalmente no hacía referencia a *L. monocytogenes* en carnes y productos cárnicos (Uruguay, 1994a). Posteriormente el Decreto N° 588/08 del Poder Ejecutivo de 1 de diciembre de 2008, actualiza el R.B.N modificando la normativa en materia de chacinados, determinando entre otros puntos los parámetros microbiológicos donde incluye ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de muestra para jamón cocido y paleta cocida (Uruguay, 1994b).

Actualmente los productos cárnicos listos para el consumo están regulados por la Norma Reglamentaria N° 1/2013 del 8 de abril del 2013 del MGAP. La misma establece un programa de control oficial para *L. monocytogenes* y *Salmonella* en alimentos cárnicos prontos para comer, y un programa de autocontrol de las empresas para *L. monocytogenes* en el medio ambiente (Anexo A).

En materia exportaciones, el único mercado que exige muestreos de *L. monocytogenes* es Rusia. Los mismos deben hacerse de acuerdo al plan de muestreo recomendado por la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), descrito en la Norma Reglamentaria N° 2/2012 del 29 de octubre de 2012 del MGAP (Anexo B).

Conclusiones

De acuerdo a los datos recabados a lo largo de esta revisión podemos concluir que estamos frente a uno de los patógenos reemergentes más importantes a nivel mundial: *Listeria monocytogenes*, ya que se encuentra distribuido en todo el mundo con graves consecuencias como placentitis, meningoencefalitis, septicemia o incluso la muerte, siendo los neonatos, ancianos y personas inmunocomprometidas los más propensos.

Con la presencia confirmada de *Listeria monocytogenes* en alimentos en nuestro país, y la importancia de la carne y la industria cárnica en nuestro medio, considero fundamental la educación en prevención de los consumidores e industrias, ya que como hemos visto éste patógeno puede llegar a tener consecuencias muy graves tanto a nivel de la salud pública como a nivel económico para las empresas.

Visto las reglamentaciones y controles existentes en Uruguay y comparándolas con el resto del mundo puedo concluir que todavía hay mucho trabajo por delante, sobre todo en materia de epidemiología, ya que no se cuenta con una base de datos establecida oficialmente sobre ésta enfermedad, lo que llevaría a pensar que la misma está altamente subdiagnosticada en nuestro medio.

Por lo tanto, considero de vital importancia continuar con la investigación y difusión de ésta temática tanto a nivel público como académico, mejorar la vigilancia epidemiológica y enfatizar los controles y métodos de prevención a lo largo de toda la cadena cárnica, ya que la ocurrencia de un brote de ésta enfermedad perjudicaría gravemente la salud del consumidor y la imagen de la industria en el Uruguay.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acuña, A.M., Alfonso, A., Algorta, G., Anchieri, D., Bentancor, L., Chabalgoity, A., Chiparelli, H., Da Silva, A., Deambrosis, N., Ferrari, A.M., Gadea, P., Gularte, E., Legani, M., Linder, C., Macedo, M., Martínez, A., Mateos, S., Mattera, A., Medina, D., Montano, A., Odizzio, M., Pérez, M., Repiso, M., Rodríguez, G., Salvatella, R., Sabio, M., Schelotto, F., Torres, M., Varela, G., Vicentino, W. (2002) Enfermedades transmitidas por los alimentos en Uruguay. Montevideo. Panalimentos, OPS. 203p.
2. Alcayaga, S., Hott, B. (2008) Listeria y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. *Revista Chilena de Salud Pública*, 12 (3): 188-195.
3. Altuntas, E.G., Kocan, D., Consansu, S., Ayhan, K., Juneja, V.K., Materon, L. (2012) Antibiotic and bacteriocin sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different foods, *Food and Nutrition Sciences*, 3 (3): 363-368.
4. Allerberger, F., Wagner, M. (2010) Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (1): 16-23.
5. Alles, S., Curry, S., Almy, D., Jagadeesan, B., Rice, J., Mozola, M. (2012) Reveal Listeria 2.0 test for detection of *Listeria* spp. in foods and environmental samples. *Journal of AOAC International*, 95 (2): 424 - 434.
6. ANMAT (2014) Código Alimentario Argentino. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp. Fecha de consulta: 18/8/2014.
7. Anónimo (2005) Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. Disponible en: <https://www.um.es/casan/documentos/legislacion/ALIMENTARIA/CRITERIOS%20MICROBIOLOGICOS/reglamento-2073-2005.pdf>. Fecha de consulta: 16/8/2014.
8. Balsalobre, B., Hernández, J. (2004) Resistencias a antibióticos en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* entérica aislados de alimentos de origen animal. *Revista de Salud Ambiental*, 4 (1-2): 42-46.
9. Barton, C., Jones, T.F., Vugia, D.J., Long, C., Marcus, R., Smith, K., Thomas, S., Zansky, S., Fullerton, K.E., Henao, O.L., Scallan, E., FoodNet Workin Group. (2011) Deaths associated with bacterial pathogens transmitted commonly through food: Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 1996–2005. *The Journal of Infectious Diseases*, 204 (2): 263-267.
10. Bell, C., Kyriakides, A. (2002) *Listeria monocytogenes*. En: de W. Blackburn Clive, Mc Clure Peter J (Eds.) *Foodborne pathogens Hazards, risk analysis and control*. Florida. CRC Press, pp 337-361.
11. Benadof, D. (2008) Retrato Microbiológico: *Listeria monocytogenes*. *Revista Chilena de Infectología*, 25 (5): 350.

12. Bonardi S., Bottarelli A., Fusaro S., Bentley S., Gnappi A., Morini A., (1997) Epidemiological investigation on *Listeria* spp. in a bovine slaughterhouse. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria*, 27: 181-188.
13. Bonazzi, M., Lecuit, M., Cossart, P. (2009) *Listeria monocytogenes* internalin and E-cadherin from structure to pathogenesis. *Cellular Microbiology*, 11 (5): 693-702.
14. Bortolussi, R. (2008) Listeriosis: a primer. *Canadian Medical Association Journal*, 179 (8): 795-797.
15. Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F., Call, D.R. (2003) Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (12): 7336-7342.
16. Botzler, R.G., Cowan, A.B., Wetzler, T.F. (1974) Survival of *Listeria monocytogenes* in soil and water. *Journal of Wildlife Diseases*, 10 (3): 204-212.
17. Bowmer, E.J., McKiel, J.A., Cockcroft, W.H., Schmitt, N., Rappay, D.E. (1973) *Listeria monocytogenes* infections in Canada. *Canadian Medical Association Journal*, 109 (2): 125-129.
18. Callejo, R., Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, F., Martínez, G. (2008) Manual de procedimientos. Aislamiento, identificación y caracterización de *L. monocytogenes*. Disponible en: <http://fos.panalimentos.org/LinkClick.aspx?fileticket=%2F8wNhVX5bBc%3D&tabid=120&mid=460&language=es-ES>. Fecha de consulta: 14/3/2014.
19. Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., Cabanes, D. (2011) The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2 (5): 379-394.
20. CDC (2013) Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food- foodborne diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996-2012. Disponible en: http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6215a2.htm?s_cid=mm6215a2_w. Fecha de consulta: 12/6/2014.
21. CDC (2014a) Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet surveillance report for 2012 (Final Report). Disponible en: http://www.cdc.gov/foodnet/PDFs/2012_annual_report_508c.pdf. Fecha de consulta: 25/7/2014.
22. CDC (2014b) *Listeria* (Listeriosis). Disponible en: <http://www.cdc.gov/spanish/listeria/statistics.html>. Fecha de consulta: 9/8/2014.
23. CDC (2014c) *Listeria* (Listeriosis) statistics. Disponible en: <http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html>. Fecha de consulta: 12/6/14.
24. Cecchini, E., Picandet, A.M., González, S.E. (2008) Listeriosis. En: Cecchini, E., González, S.E. (Eds.) *Infectología y enfermedades infecciosas*. Buenos Aires, Ediciones Journal, pp 546-553.

25. Cisternas, V.A., Lagos, N.N., Galstuch, L.J., González, R.C., García, C.C., Díaz, T. J. (2002) Infección por *Listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado perinatal. *Revista Chilena de Obstetricia y Ginecología*, 67 (3): 237-241.
26. Cole, M.B., Jones, M.V., Holyoak, C. (1990) The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 69 (1): 63-72.
27. Conti, I.A. (2001) Enfermedades emergentes y reemergentes en Uruguay. *Revista Médica del Uruguay*, 17 (3): 180-199.
28. Chen, J., Luo, X., Lingli, J., Jin, P., Wei, W., Liu, D., Fang, W. (2009) Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiology*, 26 (1): 103-111.
29. Chico, I., Suárez, M., González, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W. (2001) Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (1): 431-436.
30. Chin, J. (2001) El control de las enfermedades transmisibles. 17^a ed. Washington. OPS 748 p.
31. CHROMagar (2013) CHROMagar *Listeria*. CHROMagar Identification *Listeria*. Para la detección, enumeración y confirmación de *Listeria monocytogenes*. Versión 5. París, CHROMagar, 1p.
32. CHROMagar (2014a) CHROMagar *Listeria*. Instrucciones de uso. Versión 5. París, CHROMagar, 3p.
33. CHROMagar (2014b) CHROMagar Identification *Listeria*. Instrucciones de uso. Versión 4. París, CHROMagar, 3 p.
34. de Boer, E. (2009) Detección y recuento de patógenos en la carne, carne de ave y ovoproductos. En: Mead G. C (Ed.) *Análisis microbiológico de carne roja, aves y huevos*. Zaragoza, Acribia, pp 199-241.
35. de las Heras, A., Cain, R.J., Bielecka, M.K., Vázquez, J.A. (2011) Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Current Opinion in Microbiology*, 14 (2): 118-127.
36. de Souza, A. (2014) I Taller internacional sobre *Listeria monocytogenes*. *Carnes & Alimentos*, 15 (49): 36 – 43.
37. de Valk, H., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Desenclos, J.C., Martin, P., *Listeria* Working Group. (2003) Feasibility study for a collaborative surveillance of *Listeria* infections in Europe. Disponible en: http://www.invs.sante.fr/publications/2004/listernet/rap_listernet_p1_76.pdf. Fecha de consulta: 26/6/2014.

38. de Valk, H., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Simon, F., Desenclos, J.C., Martin P. (2005) Surveillance of Listeria infections in Europe. *Eurosurveillance*, 10 (10-12): 251-255.
39. Denny, J., McLauchlin, J. (2008) Human Listeria monocytogenes infections in Europe - An opportunity for improved european surveillance. *Eurosurveillance*, 13 (1-3): 32-36.
40. Díaz, T., Caballero, Á.E., Díaz, J.R. (2008) Enfermedades transmitidas por alimentos. En: Caballero Torres Ángel E. (Ed.) *Temas de Higiene de los Alimentos*, La Habana, Ciencias Médicas, pp 216-248.
41. Domínguez, M. (2010), Listeriosis. Una zoonosis emergente de transmisión alimentaria. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/1112/1129>. Fecha de consulta: 27/5/2014.
42. Donnelly, C.W., Brackett, R.E., Doores, S., Lee, W.H., Lovett, J. (1992) Listeria. En: Vanderzant, C., Splittstoesser (Eds.) *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. 3^a ed. Washington. American Public Health Association, pp 637-663.
43. Doyle, M.E., Mazzota, A.S., Wang, T., Wiseman, D.W., Scott, V.N. (2001b) Heat Resistance of Listeria monocytogenes. *Journal of Food Protection*, 64 (3): 410-429.
44. Doyle, M.P. (2001a) *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Zaragoza, Acribia 799p.
45. Dramsi, S., Bourdichon, F., Cabanes, D., Lecuit, M., Fishi, H., Cossart, P. (2004) FbpA, a novel multifunctional Listeria monocytogenes virulence factor. *Molecular Microbiology*, 53 (2): 639-649.
46. Duché, O., Trémoulet, F., Glaser, P., Labadie, J. (2002) Salt stress proteins induced in Listeria monocytogenes. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (4): 1491-1498.
47. EFSA (2007) Request for updating the former SCVPH opinion on Listeria monocytogenes risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different levels of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods and the related risk for human illness. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/599.pdf>. Fecha de consulta: 16/8/2014.
48. EFSA (2009) Trends and Sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2007. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/223r.pdf>. Fecha de consulta: 17/6/14.
49. EFSA (2010) Trends and Sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2008. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1496.pdf>. Fecha de consulta: 17/6/14.
50. EFSA (2011) Trends and Sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2009. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2090.pdf>. Fecha de consulta: 17/6/14.

51. EFSA (2012) Trends and Sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2010. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>. Fecha de consulta: 17/6/14.
52. EFSA (2013) Trends and Sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2011. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3129.pdf>. Fecha de consulta: 17/6/14.
53. EFSA (2014) Trends and Sources of zoonoses, zoonotic agents and antimicrobial resistance in the European Union in 2012. Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3547.pdf>. Fecha de consulta: 17/6/14.
54. El País (2013a) Las 5 tendencias de los uruguayos en consumo de alimentos envasados. Disponible en: <http://www.elpais.com.uy/economia/noticias/tendencias-uruguayos-consumo-alimentos-ensados.html>. Fecha de consulta: 21/8/2014.
55. El País (2013b) Estiman que el consumo de chacinados seguirá al alza. Disponible en: <http://historico.elpais.com.uy/130309/pecono-701241/economia/estiman-que-el-consumo-de-chacinados-seguira-al-alza/>. Fecha de consulta: 9/5/2014.
56. Farber J.M., Peterkin P.I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55 (3): 476-511.
57. Farber, J.M., Losos, J.Z. (1988) *Listeria monocytogenes*: a food borne pathogen. *Canadian Medical Association Journal*, 138 (5): 413-418.
58. Frazier, W.C., Westhoff, D.C. (1993) *Microbiología de los alimentos*. 4^a ed. Zaragoza, Acribia, 681 p.
59. Galliot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S., Berche, P. (2000) The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 35 (6): 1286-1294.
60. Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G., Portnoy, D.A. (2000) Role of listeriolysin o in cell to cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 68 (2): 999-1003.
61. Godshall, C.E., Suh, G., Lorber, B. (2013) Cutaneous listeriosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 51 (11): 3591-3596.
62. Goulet, V., Hedberg, C., Le Monnier, A., de Valk, H. (2008) Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerging Infectious Diseases*, 14 (5): 734-740.
63. Graves, L.M., Helsel, L.O., Steigerwalt, A.G., Morey, R.E., Daneshvar, M.I., Roof, S.E., Orsi, R.H., Fortes, E.D., Milillo, S.R., Den Bakker, H.C., Wiedmann, M., Swaminathan, B., Sauders, B.D., (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 60 (6): 1280-1288.

64. Guía VETA (2001) Guía para el establecimiento de sistemas de vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos (VETA) y la investigación de brotes de toxoinfecciones alimentarias. Buenos Aires, OPS/OMS/INPPAZ. Disponible en: <https://www.assal.gov.ar/assa/userfiles/file/guia%20veta.pdf>. Fecha de consulta: 12/3/2014.
65. Hammer, W.C.K. (1999) Situación actual del comercio alimentario, incluidos los problemas relacionados con la calidad e inocuidad de los alimentos. Conferencia sobre Comercio Internacional de Alimentos a Partir del Año 2000: Decisiones basadas en criterios científicos, armonización, equivalencia y reconocimiento mutuo. Melbourne, Australia, 11-15 de octubre de 1999. Disponible en: <http://www.fao.org/docrep/meeting/x2636s.htm>. Fecha de consulta: 13/5/2014.
66. INAC (2014b) Cierre Año 2013, Evolución de los Principales Indicadores y Determinantes del Consumo de Carnes en el Mercado Interno. Montevideo, INAC 11 p.
67. INAC (Instituto Nacional de Carnes) (2014a) Uruguay, país ganadero. Disponible en: http://www.inac.gub.uy/innovaportal/v/3104/1/innova.net/uruguay_pais_ganadero. Fecha de consulta 9/5/2014.
68. International Comision on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (2005) Microorganisms in foods 6 Microbial Ecology of Food Commodities. 2ª ed. New York, Kluwer, 763 p.
69. International Comission on Microbiological Specificaions for Foods, (ICMSF) (1998) Microorganismos de los alimentos 5 Características de los patógenos microbianos, Zaragoza, Acribia 620 p.
70. Jay, J.M (2009) Microbiología moderna de los alimentos 5ª ed. Zaragoza, Acribia 788p.
71. Julián, A., Jiménez, Á., de Górgolas, M., Fernández, R., Fernández, M.L. (2001) Infecciones por *Listeria monocytogenes* en el adulto. Aspectos clínicos y microbiológicos de una enfermedad cambiante. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 19 (7): 297-303.
72. Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P., Le Flèche-Matéos, A., Roche, S., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M., Allerberger, F., (2010) *Listeria rocourtiae* sp.nov. *International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology*, 60 (9): 2210-2214.
73. Lecuit, M., Vandormael-Pournin, Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C., Cossart, P. (2001) A transgenic model for listeriosis: Role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science*, 292 (5522): 1722-1725.
74. Ledermann, W.D. (2008) En memoria de Lister. *Revista Chilena de Infectología*, 25 (5): 351-356.
75. Lemaire, V., Cerf, O., Audurier, A., (1989) Thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *Annales de Recherches Vétérinaires*, 20 (4): 493-500.
76. Lepe, J.A., Jiménez, F. (2012) Listeriosis neonatal de transmisión nosocomial. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30 (3): 115-116.

77. Leyva, V., Martino, T.K., Puig, Y. (2008) Factores que influyen en el crecimiento y supervivencia de los microorganismos. En: Caballero Torres Ángel E. (Ed.) Temas de Higiene de los Alimentos, La Habana,-Ciencias Médicas, pp 43-54.
78. Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J., Austin, F.W. (2005) Comparative assessment of acid, alkali and salt tolerance in *Listeria monocytogenes* virulent and avirulent strains, FEMS Microbiology Letters, 243 (2): 373-378.
79. Liu, D., Lawrence, M.L., Ainsworth, A.J., Austin, F.W. (2007) Toward an improved laboratory definition of *Listeria monocytogenes* virulence. International Journal of Food Microbiology, 118 (2): 101-115.
80. Lorber, B. (2010) *Listeria monocytogenes*. En: Mandell Gerald L., Bennet John E., Dolin Raphael (Eds.) Mandell, Douglas, and Benetts's Principles and Practice of Infectious Diseases. 7^a Ed. Philadelphia. Churchill Livingstone, pp 2707-2714.
81. Lou, Y., Yousef, A.E. (1997) Adaptation to Sublethal Environment Stress Protects *Listeria monocytogenes* against Lethal Preservation Factors. Applied and Environmental Microbiology, 63 (4): 1252-1255.
82. Lundén, J., Tolvanen, R., Korkeala, H. (2004) Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. Journal of Dairy Science, 87 (Supp): E6-E12.
83. Mackey, B.M., Bratchel, N., (1989) The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 9 (3): 89-94.
84. Madigan, M.T (2003) Brock Biología de los microorganismos 10^a ed. Madrid, Pearson Prentice Hall 1096p
85. Manzullo, A. (1980) Epidemiología y epizootiología de la listeriosis. Simposio sobre Listeriosis, Buenos Aires, Argentina, p 11.
86. Martino, T., Leyva, V., Puig, Y. (2008) Principales bacterias patógenas en alimentos. En: Caballero Torres Ángel E. (Ed.) Temas de Higiene de los Alimentos, La Habana, Ciencias Médicas, pp 29-42.
87. Metselaar, K.I., den Besten, H., Abee, T., Moezelaar, R., Zweijterring, M.H. (2013) Isolation and quantification of highly acid resistant variants of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 166 (3): 508-514.
88. Michanie, S. (2004) *Listeria monocytogenes* la bacteria emergente de los 80. Ganados & Carnes, 18: 34-37.
89. Ministerio de Salud Pública (MSP), Uruguay. Listado denuncia obligatoria. Disponible en: http://www2.msp.gub.uy/ucepidemiologia_337_1.html. Fecha de consulta: 26/8/2014.
90. MINSAL (Ministerio de Salud de Chile) (2009) Modifica decreto n° 977, de 1996. Disponibl en: <http://www.leychile.cl/Navegar?idNorma=1008896&idParte=8813644&idVersion=2009-12-11>. Fecha de consulta: 18/8/2014.

91. Molina, S., Mercado, M., Carrascal, A.K. (2009) Efecto de tiempo y temperatura de cocción en chorizo inoculados artificialmente con *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientiarum*, 15 (2-3): 198-205.
92. Muñoz, A.I., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., Guzmán, V. (2011) Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomédica*, 31 (3): 428-439.
93. Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaüer, M.A. (2006) *Microbiología Médica*. 5^a ed. Madrid, Elseiver, 976 p.
94. Nair, S., Frehel, C., Nguyen, L., Escuyer, V., Berche, P. (1999) ClpE, a novel member of the HSP100 family, is involved in cell division and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Molecular Microbiology*, 31 (1): 185-196.
95. Neogen (2013) *Reveal 2.0 for Listeria*. Lansing, Neogen, 6 p.
96. O'Driscoll, B., Gahan, G.M., Hill, C. (1996) Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (5): 1693-1698.
97. OIE (2013) *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2013*. Disponible en <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/>. Fecha de consulta 17/3/2014.
98. OMS (2012) *Resistencia a los antimicrobianos (RAM)*. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>. Fecha de consulta: 24/4/2014.
99. OMS (2014) *10 datos sobre la inocuidad de los alimentos*. Disponible en: http://www.who.int/features/factfiles/food_safety/facts/es/index1.html. Fecha de consulta: 9/8/14.
100. Oteo, J., Alós, J.I. (1997) *Listeria y listeriosis*. Disponible en: <http://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/listeria.pdf>. Fecha de consulta: 24/4/2014.
101. PHAC (2014) *List of Nationally Notifiable Diseases*. Disponible en: <http://dsol-smed.phac-aspc.gc.ca/dsol-smed/ndis/list-eng.php>. Fecha de consulta 12/6/14.
102. Phan-Thanh, L., Montagne, A. (1998) Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 44 (3): 183-191.
103. Pickering, L.K., Baker, C.J., Overturf, G.D., Prober, C.G. (2005) *Red Book Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 26^a ed. Buenos Aires, Médica Panamericana, 984 p.
104. Pizarro, J., Cossart, P. (2006) Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124 (4): 715-727.

105. Prescott, Lansing M., Harley John P., Klein Donald A. (2004) *Microbiología* 5^a ed. Madrid. McGraw-Hill / Interamericana, 1240 p.
106. Ramaswamy, V., Cresence, V.M., Rejitha, J.S., Lekshuni, M.U., Dharsana, K.S., Prasad, S.P., Vijila, H.M. (2007) *Listeria*-review of epidemiology and pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 40 (1): 4-13.
107. ReNaLOA (2011) *Análisis Microbiológico de los Alimentos*. Disponible en: http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf. Fecha de consulta: 14/8/14.
108. Riedo, F.X., Pinner, R.W., Tosca, M.L., Cartter, M.L., Graves, L.M., Reeves, M.W., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Broome, C.V. (1994) A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 170 (3): 693-696.
109. Rocourt, J., Buchrieser, C. (2007) The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy, and identification. En: Ryser Elliot T, Marth Elmer H (Eds.) *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 3^a ed. Florida. CRC, pp 1-20.
110. Rossi, M.L., Paiva, A., Tornese, M., Chainelli, S., Troncoso, A. (2008) Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Revista Chilena de Infectología*, 25 (5): 328-335.
111. Rouquette, C., de Chastellier, C., Nair, S., Berche, P. (1998) The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Molecular Microbiology*, 27 (6): 1235-1245.
112. Rovira, P. (2006) Inocuidad de carnes: un tema relevante en la agenda del INIA. *Revista INIA* N° 9, 13 p.
113. Safdar, A., Armstrong, D. (2002) Antimicrobial Activities against 84 *Listeria monocytogenes* isolates from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (1): 483-485.
114. Saunders, B.D., Wiedmann, M. (2007) Ecology of *Listeria* Species and *L. Monocytogenes* in the Natural Environment. En: Ryser Elliot T, Marth Elmer H (Eds.) *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 3^a ed. Florida. CRC, pp 21-53.
115. Scortti, M., Monzó, H.J., Lacharme, L., Lewis, D.A., Vázquez, J.A. (2007) The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection*, 9 (10): 1196-1207.
116. Schöbitz, R., Ciampi, L., Nahuelquin Y. (2009) *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, 37 (1): 1-8.
117. Shabala, L., Lee, S.H., Canesson, P., Ross, T. (2008) Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *Journal of Food Protection*, 71 (6): 1169-1177.
118. Shen, Y., Naujokas, M., Park, M., Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell*, 103 (3): 501-510.

119. Soyutemiz, G.E., Çetinkaya, F. (2005) Thermal Resistance of *Listeria monocytogenes* in Inegöl Meatballs. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29 (2): 319-323.
120. Stachi, N.O. (2007) *Microbiología Veterinaria*. Buenos Aires, Intermédica 571p.
121. Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., Švabić-Vlahović, M. (2004) Biofilm formation by *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38 (5): 428-432.
122. Taormina, P.J., Beuchat, L.R. (2001) Survival and Heat Resistance of *Listeria monocytogenes* after Exposure to Alkali and Chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (6): 2555-2563.
123. Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., Mercado, M. (2005) Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Revista MVZ Córdoba*, 10 (1): 511-543.
124. Uruguay (1994a) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N° 315/994 de 5 de julio de 1994. 2ª ed. Montevideo, IMPO, 454p.
125. Uruguay (1994b) Reglamento Bromatológico Nacional. Decreto N° 315/994 de 5 de julio de 1994. Anotado y concordado con apéndice normativo. 5ª ed. Montevideo, IMPO, 648 p.
126. Uruguay. Código Nacional sobre enfermedades y eventos sanitarios de notificación obligatoria. (2004). Montevideo, Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa y Enfermedades Prevalentes. 81 p.
127. Vázquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., Kreft, J. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (3): 584-640.
128. Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A. (2001) Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology*, 90 (4): 517-522.
129. Welshimer, H.J. (1960) Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *Journal of Bacteriology*, 80 (3): 316-320.
130. Wesley, I.V. (2007) *Listeriosis in animals*. En: Ryser Elliot T, Marth Elmer H (Eds.) *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 3ª ed. Florida. CRC, pp 55-84.
131. WHO/FAO (2004) Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/RA_Listeria_report_contents.pdf. Fecha de consulta: 17/5/2014.
132. Woller, T. (2013) Inspección de alimentos basada en riesgo. Disponible en: <http://www.osancolombia.gov.co/Portals/0/TallerInocuidad/MODULO%20IIA%20-%20Estadisticas%20de%20ETAS.pdf>. Fecha de consulta: 25/7/14.

133. Wuenscher, M.D., Köhler, S., Bubert, A., Gerike, U., Goebel, W. (1993) The *iap* gene of *Listeria monocytogenes* is essential for cell viability, and its gene product, p60, has bacteriolytic activity. *Journal of Bacteriology*, 175 (11): 3491-3501.
134. Zamora, J.M., Chaves, C., Arias, M.L. (2006) Comparación del perfil de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 56 (2): 171-174.
135. Zarei, M., Pourmahdi, B.M., Khezzadeh, M. (2012) Comparing the effect of NaCl and KCl on the growth of *Listeria monocytogenes* with a view to NaCl replacement. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 13 (2): 147-151.

ANEXOS

Anexo A:



**DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS GANADEROS
DIVISION INDUSTRIA ANIMAL**

**NORMA REGLAMENTARIA N° 1/2013
8 de abril de 2013**

**PROGRAMA DE CONTROL OFICIAL PARA *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*
EN ALIMENTOS CARNICOS PRONTOS PARA COMER, Y PROGRAMA DE
AUTOCONTROL PARA *Listeria monocytogenes* EN MEDIO AMBIENTE.**

PROGRAMA OFICIAL PARA ALIMENTOS CÁRNICOS PRONTO PARA COMER.

ALCANCE

A los **alimentos cárnicos** prontos para comer, que son elaborados en establecimientos habilitados y controlados por el Departamento Establecimientos Industrializadores de la División Industria Animal.

DESCRIPCION

El plan para el Programa de Control Oficial de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* es: $n= 5$, $c = 0$ y $m = 0$.

El alimento deberá ser muestreado una vez que se encuentre en su envase final. El tamaño de la muestra no podrá ser inferior a 100g y el envase utilizado para almacenar dicha muestra debe ser precintado, a los efectos de conservar su inviolabilidad.

La frecuencia de muestreo será semanal, como mínimo, quedando a criterio de la Inspección Veterinaria Oficial (IVO), el aumento de la frecuencia, cuando el riesgo así lo indique. Se deberá rotar el muestreo de cada alimento en oportunidad de cada toma de muestra, manteniendo la precaución de no omitir ninguno de los mismos, de manera que, una vez finalizada una ronda de muestreo, hayan sido muestreados todos los alimentos que se elaboren en el establecimiento.

Si por motivos comerciales, alguno de los alimentos autorizados a elaborar en el establecimiento no son producidos por un lapso de tiempo mayor al de una ronda, deberá dejarse registrada esta situación en la IVO.

En todos los casos de obtenerse resultados no conformes en las muestras oficiales se procederá con la siguiente secuencia:

1. La IVO notificará a la empresa el hallazgo.
2. La IVO retendrá toda la mercadería correspondiente al lote involucrado y dispondrá que la empresa inicie el procedimiento de “recall”, según lo establecido en el Manual de GMP.
3. La IVO suspenderá la producción de la línea del o de los alimentos involucrados.
4. La IVO notificará a la empresa, quien deberá realizar la investigación del origen de la contaminación, proponiendo las acciones correctivas que correspondan. Estas acciones correctivas propuestas por la empresa serán puestas en conocimiento de la IVO.
5. Luego de implementadas las acciones correctivas por parte de la empresa, será verificado su cumplimiento por parte de la IVO.
6. Habiéndose cumplido con lo dispuesto en los numerales anteriores, se podrá autorizar el reinicio de la producción de la línea respectiva.
7. Los alimentos producidos en esa línea, a partir de este momento, serán muestreados por la IVO dentro de un plan de seguimiento. Este plan consistirá en muestrear por cinco días consecutivos, todos los lotes elaborados en la línea.
8. Todos los lotes de mercadería producida y muestreada deberán ser retenidos hasta tanto se cuente con los resultados analíticos.
9. Si los resultados obtenidos son conformes, se liberará la mercadería.
10. Si en el plan de seguimiento se obtuviera un resultado no conforme, se reiterarán las acciones, según lo dispuesto en los numerales 1 a 8.
11. En casos de reiteración de situaciones de no conformidad, la DIA podrá tomar otras acciones, pudiendo llegar a la suspensión definitiva de la elaboración de los productos involucrados.

PROGRAMA DE AUTOCONTROL MEDIOAMBIENTAL

ALCANCE

Al medio ambiente de edificación e instalaciones comprendidos en los establecimientos elaboradores de alimentos prontos para comer, habilitados y controlados por la División Industria Animal.

DESCRIPCION

Los mencionados establecimientos procesadores deberán tener un programa de autocontrol microbiológico aplicable a medio ambiente para *Listeria monocytogenes*.

Especialmente, deberán ser consideradas todas las superficies, ya sea que entren o no en contacto con el alimento.

Este programa y los resultados deberán ser puestos en conocimiento de la IVO, quién los evaluará. El mencionado programa deberá detallar número de muestras, lugares de muestreo, frecuencia de muestreo y plan de acción en caso de no conformidades.

Los resultados de este programa podrán ser usados para evaluar el riesgo de contaminación del alimento, para fijar una línea de base que permita diseñar el plan de muestreo e investigar fuentes de contaminación.

La empresa lo diseñará zonificando las áreas del establecimiento, de acuerdo con el riesgo y con las líneas de proceso.

Todos los resultados obtenidos deberán ser registrados en gráficos de control para analizar tendencias y deberán ser comunicados a la IVO, quien verificará su cumplimiento.

Cuando se encuentren resultados no conformes se activará el plan de acción que ya haya previsto el establecimiento. Dependiendo de los hallazgos, el programa considerará la investigación por muestreos para identificar el origen de la contaminación, aumentar la frecuencia de muestreo sobre un cierto período de tiempo, revisión y cambio de los puntos de muestreo, actividades de higiene y capacitación del personal.

Anexo B:



**REPÚBLICA ORIENTAL DE URUGUAY MINISTERIO DE GANADERIA,
AGRICULTURA Y PESCA DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS GANADEROS**

Montevideo, 1 de noviembre de 2012

DGSG/ N° 189/012

VISTO: la necesidad de adecuar los controles higiénico sanitarios de la carne fresca con destino a exportación, exigidos por los mercados compradores;

RESULTANDO: I) las autoridades sanitarias de la Federación Rusa han detectado la presencia de ciertos microorganismos tales como *Listeria monocytogenes*, en carne fresca proveniente de Uruguay;

II) esta Dirección General, a través de la División Industria Animal, ha acordado con la Federación Rusa, la certificación sanitaria para la carne fresca uruguaya con destino a dicho mercado;

CONSIDERANDO: I) necesario, instrumentar nuevos controles sobre la calidad microbiológica de carne cruda a exportar a la Federación Rusa, con el fin de otorgar mayores garantías a las autoridades sanitarias de dicho mercado;

II) de acuerdo con lo establecido por el decreto N° 369/983 de fecha 7 de octubre de 1983, (Reglamento Oficial de Inspección Veterinaria de Productos de Origen Animal) y decreto N° 24/998 de 28 de enero de 1998, compete a la Dirección General de Servicios Ganaderos, a través de la División Industria Animal, controlar y certificar las exportaciones de carne y productos cárnicos;

ATENTO: a lo precedentemente expuesto y a lo dispuesto por la Ley N° 3.606, de fecha 13 de abril de 1910 modificativas y complementarias; Decreto N° 369/983, de fecha 7 de octubre de 1983, (Reglamento Oficial de Inspección Veterinaria de Productos de Origen Animal); Decreto N° 24/998, de fecha 28 de enero de 1998 y Resolución DGSG/RG N° 29/002, de fecha 27 de mayo de 2002;

**LA DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS GANADEROS
RESUELVE**

1. Apruébase la Norma Reglamentaria para la certificación microbiológica de carne fresca (enfriada o congelada) para exportar a la Federación Rusa, la cual se adjunta en el Anexo, y forma parte integrante de la presente resolución.

2. Los titulares de los establecimientos interesados en exportar carne fresca especificada en el numeral anterior con destino a la Federación Rusa, deberán estar habilitados y registrados en la División Industria Animal y cumplir con las disposiciones contenidas en el Anexo de la presente resolución.

3. La Inspección Veterinaria Oficial (IVO) del establecimiento habilitado sólo podrá certificar, con destino a la Federación Rusa, la carne fresca cuyos resultados de ensayo se encuentren dentro de los límites microbiológicos establecidos en el Anexo.
4. La carne fresca con destino al mercado de la Federación Rusa, deberá salir del establecimiento habilitado, acompañada de una copia de los resultados analíticos de los lotes correspondientes, adjunto al Certificado Oficial de Transferencia de Exportación (COTE).
5. Los análisis microbiológicos exigidos, tanto de carácter oficial como de autocontrol, deberán ser realizados por Laboratorios habilitados por la Dirección General de Servicios Ganaderos a través de la División Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” (DILAVE), y autorizados para realizar ensayos de *Listeria monocytogenes*. A dichos efectos, los laboratorios habilitados deberán contar con la acreditación de los métodos de ensayo ISO 11290-1, u otros métodos validados por un organismo reconocido, que garanticen resultados equivalentes (tales como AOAC, AFNOR, APHA). La expresión de resultados en el informe de ensayo, debe corresponder al método analítico utilizado.
6. Los costos analíticos serán de cargo de los establecimientos exportadores habilitados por la División Industria Animal.
7. Deróguense las Resoluciones y Normas Reglamentarias que difieran o se opongan directa o indirectamente a las disposiciones contenidas en la presente resolución y su anexo.
8. Comuníquese a las Divisiones Industria Animal, Sanidad Animal y Laboratorios Veterinarios “Miguel C. Rubino” (DILAVE), de Montevideo e Interior del país y, por su intermedio, notifíquese a los actores involucrados.
9. Publíquese en el Diario Oficial y en la Página Web del MGAP.



Dr. Francisco Muzio
Director General

ANEXO

DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS GANADEROS

DIVISIÓN INDUSTRIA ANIMAL

Norma Reglamentaria 2 / 2012

29 de octubre de 2012

MUESTREO PARA DETERMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN CARNE FRESCA CON DESTINO A LA EXPORTACIÓN HACIA LA FEDERACIÓN RUSA.

Referencia

El plan de muestreo a aplicar para la determinación de *Listeria monocytogenes* es el recomendado por la ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods), Caso 10.

Para el caso de *Listeria monocytogenes*, se aplica como documento de referencia el SanPin 2.3.2 1078-01 de la Federación Rusa.-

Alcance

El monitoreo del producto es considerado oficial, mientras que el monitoreo ambiental es de autocontrol de la empresa y está referido al medio en el cual se desarrollan las actividades de producción del alimento.

Responsable del muestreo

La persona responsable del muestreo oficial del alimento será un funcionario de la Inspección Veterinaria Oficial (IVO), mientras que el responsable del muestreo medio ambiental será un funcionario de la empresa.

Plan de muestreo

Plan de dos (2), clases (ausencia – presencia).

n=5 c=0
M=0 en 25 g

Lote

A los efectos de esta Norma Reglamentaria, se considera un LOTE a toda la carne que pertenece al mismo embarque destinado a la exportación hacia la Federación Rusa.

Extracción de las muestras oficiales

Las cinco (5) muestras (n=5), serán extraídas en forma aséptica del lote definido.

Las cinco (5) muestras deberán ser extraídas de mercadería de diferentes fechas de producción.

En aquellos casos en que el lote esté integrado por menos de cinco días de producción, será necesario repetir más de una fecha.

Las muestras deberán tomarse en el momento en que se define el lote a ser embarcado.

El volumen de cada una de las cinco muestras no deberá ser menor a 70 g.

Extracción de las muestras de autocontrol

Los establecimientos deberán tener un programa de autocontrol microbiológico aplicable al medio ambiente, para *Listeria monocytogenes*.

En el mismo deben ser consideradas todas las superficies, ya sea que tomen contacto o no con el alimento, incluyendo agua, aire, operarios y su vestimenta.

El programa debe ser puesto en conocimiento de la IVO, para su verificación, y los resultados deberán ser comunicados oportunamente a la IVO. El mencionado programa deberá detallar número de muestras, lugares de muestreo, frecuencia de muestreo y plan de acción en caso de no conformidades.

Los resultados de este programa pueden ser usados para evaluar el riesgo de contaminación del producto, para fijar una línea de base que permita diseñar el plan de muestreo e investigar fuentes de contaminación. La empresa lo diseñará zonificando las áreas del establecimiento, de acuerdo con el riesgo y con las líneas de proceso.

Todos los resultados obtenidos deben ser registrados en gráficos de control para analizar tendencias y deben ser comunicados a la IVO.

Cuando se encuentren resultados no conformes, se activará el plan de acción que ya haya sido previsto por el establecimiento. Dependiendo de los hallazgos, el plan considerará la investigación por muestreos para identificar el origen de la contaminación, aumentar la frecuencia de muestreo sobre un cierto período de tiempo, revisión y cambio de los puntos de muestreo, actividades de higiene y capacitación del personal.

Preparación de las muestras oficiales para su envío

Las muestras se colocarán en recipientes estériles (bolsas o frascos), con identificación indeleble, clara y única, a efectos de que no haya dudas en el momento de expedir el certificado sanitario correspondiente.

Las muestras oficiales deberán ser enviadas al laboratorio, acompañadas por un documento que las identifique, debiendo mantener una copia del mismo, en las oficinas de la IVO, hasta que se reciban los resultados de los análisis correspondientes.

Registros

Los resultados de los análisis de laboratorio de las muestras oficiales deberán archivar en la oficina de la Inspección Veterinaria Oficial, por un periodo de dos años.