

**Prosperidad  
para todos**



**Libertad y Orden**  
**Ministerio de la Protección Social**  
República de Colombia



**INSTITUTO  
NACIONAL DE  
SALUD**

## **EVALUACIÓN DE RIESGOS DE *Listeria monocytogenes* EN QUESO FRESCO EN COLOMBIA**

**CONTRATO 081 DE 2010**

**República de Colombia**  
Instituto Nacional de Salud  
Subdirección de Investigación

**Prosperidad  
para todos**



Libertad y Orden  
Ministerio de la Protección Social  
República de Colombia



INSTITUTO  
NACIONAL DE  
SALUD

## **EVALUACIÓN DE RIESGOS DE *Listeria monocytogenes* EN QUESO FRESCO EN COLOMBIA**

Bogotá 2011

**IDENTIFICACIÓN DE RIESGOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS AL CONSUMO DE LECHE CRUDA BOVINA EN COLOMBIA**

Ministerio de Salud y Protección Social  
Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA  
Instituto Nacional de Salud INS  
2011  
Bogotá D.C., 2011  
Impresión: Imprenta Nacional de Colombia

©Queda prohibida la reproducción parcial o total de este documento, por cualquier medio escrito o visual, sin previa autorización del Instituto Nacional de Salud.

Interventoría:  
Sandra Liliana Fuentes Rueda - Ernesto Moreno Naranjo  
Interventores Contrato interadministrativo 081-2010 MPS – INS

**ISBN: 978-958-13-0153-9**



Libertad y Orden

**MAURICIO SANTAMARÍA SALAMANCA**

Ministro de Salud y Protección Social

**JAVIER HUMBERTO GAMBOA BENAVIDES**

Viceministro Técnico

**BEATRIZ LONDOÑO SOTO**

Viceministra de Salud

**RICARDO ANDRÉS ECHEVERRI**

Viceministro Laboral

**GERARDO LUBÍN BURGOS BERNAL**

Secretario General

**LENIS ENRIQUE URQUIJO VELÁSQUEZ**

Director General de Salud Pública

**OFICINA ASESORA DE COMUNICACIONES**

**JUAN GONZALO LÓPEZ CASAS**  
Director General Instituto Nacional de Salud

**EDITH OLIVERA MARTINEZ**  
Secretaria General

**LUIS ALBERTO GÓMEZ GROSSO**  
Subdirector de Investigación

**DIANA XIMENA CORREA LIZARAZO**  
Coordinadora Unidad de Evaluación de Riesgos para  
la Inocuidad de los Alimentos

**OFICINA DE COMUNICACIONES INS**





**GRUPO DE REDACCIÓN**  
(por orden alfabético)

**Ana Karina CARRASCAL CAMACHO**  
Bacterióloga, MSc. en Microbiología

**María Victoria CASTAÑO SEPÚLVEDA**  
Zootecnista, MSc. en Ciencia y Tecnología de Alimentos

**Mónica Sofía CORTES MUÑOZ**  
Bacterióloga y laboratorista clínico

**Diana Ximena CORREA LIZARAZO**  
Ingeniera de alimentos, MSc. en ciencia de los alimentos

**Mary Luz OLIVARES TENORIO**  
Ingeniera de alimentos, MSc. Food Quality Management

**Teresa PÉREZ HERNÁNDEZ**  
Química farmacéutica, MSc. en toxicología

**Martha Cecilia SUÁREZ ALFONSO**  
Médica Veterinario, MSc. en ciencias microbiología

## REVISORES CIENTÍFICOS

### *Revisores Internacionales:*

**Antonio MARTÍNEZ LÓPEZ** Biólogo, MSc. ciencia y tecnología de los alimentos, PhD. Biología.

**Christopher NGUYEN**

**Fernando SAMPEDRO PARRA** Licenciado en ciencia y tecnología de alimentos, Ph.D en tecnología de alimentos.

### *Revisores nacionales*

**Natalia Milena ACOSTA AMADOR** Microbióloga, especialista en epidemiología

**Yuly Andrea GAMBOA MARÍN** Bacterióloga y laboratorista clínico

**Jazmín Mercedes MANTILLA PULIDO** Médico veterinario, MSc. en salud animal

**María Pilar MONTOYA GUEVARA** Microbióloga agrícola y veterinaria

**John Alexander VÁSQUEZ CASALLAS** Zootecnista

## REMISIÓN DE OBSERVACIONES

**Bernardo CLAVIJO D** - Alpina Productos Alimenticios S.A.

**Bernadette KLOTZ CEBERIO** - Universidad de la Sabana.

**Nelson A. PÉREZ W.** – Grupo Éxito

**Nubia Pilar SARMIENTO TORRES** - Universidad de Pamplona, Santader

**Subdirección de Alimentos y Bebidas Alcohólicas** - Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – Invima.

## COLABORADORES

**Janet LUNA CORTÉS** - Microbióloga, MSc. en microbiología

## Resumen ejecutivo

*Listeria monocytogenes* es el agente causal de la Listeriosis, una de las enfermedades más importantes adquirida en el 99% de los casos por el consumo de alimentos contaminados. En el hombre se reconocen dos tipos de Listeriosis: invasiva y no invasiva (1). La primera produce la mayor tasa de hospitalización y de mortalidad (60%-80%) (2), la segunda produce gastroenteritis con baja tasa de hospitalización y mortalidad (3).

Esta bacteria ha sido asociada a alimentos tales como la leche, quesos (particularmente variedades blandos – madurados), helados y productos cárnicos. Afecta principalmente a los niños, ancianos, mujeres gestantes y personas inmunosuprimidas, ocasionando abortos, meningoencefalitis y meningitis.

Entre 1995 y 2009 se identificaron en el mundo 11 brotes de listeriosis asociados al consumo de quesos, con 545 personas afectadas, con tasas de mortalidad estimadas entre el 14% y 30% y de hospitalización hasta del 100 %. En Colombia no hay reportes de brotes de listeriosis asociados al consumo de queso, sin embargo, en el 2009, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) reportó un caso con manifestaciones de meningitis en un niño de 9 años debido al consumo de queso fresco.

En cuanto a los serotipos de *L. monocytogenes* circulantes en Colombia, son pocos los reportes oficiales debido a que el Laboratorio Nacional de Referencia del Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima ) solo confirma y serotipifica las cepas remitidas a la Red Nacional de Laboratorios. De un total de 294 cepas de *L. monocytogenes* serotipificadas en el periodo comprendido entre el 2000 y el 2003, provenientes de alimentos, se encontró que el serotipo predominante fue el 4b.

La selección del tipo de queso para el desarrollo de este documento se realizó con la información de la prevalencia de los serotipos de *L. monocytogenes* suministrada por el Invima para el período 2000- 2009 (4). Con los datos disponibles, el queso campesino aparece como el que presenta mayor prevalencia de *L. monocytogenes*. Con esta información se estableció que las zonas geográficas objeto fueran Antioquia, Nariño y el Distrito de Bogotá por ser las que presentan mayor número de aislamientos de *L. monocytogenes*.

La contaminación del queso con *L. monocytogenes* puede abarcar todas las etapas de la cadena agroalimentaria por factores como la presencia de mastitis subclínica, el deterioro de la infraestructura, la contaminación de pisos y/o equipos, deficientes procedimientos de limpieza y desinfección, presencia de biopelículas, temperaturas de almacenamiento inadecuada, contaminación cruzada, entre otros.

## ÍNDICE

1.	Justificación, Términos de Referencia, Alcance y Objetivos .....	15
2.	Introducción .....	17
3.	Identificación del Peligro .....	19
3.1	Brotos Causados Por <i>Listeria Monocytogenes</i> En Queso Fresco.....	19
3.2	Prevalencia de <i>L. Monocytogenes</i> en quesos.....	21
3.3	Métodos de identificación y detección de <i>L. Monocytogenes</i> .....	25
3.3.1	Métodos de identificación y detección de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de queso ..	25
3.3.2	Métodos de detección de <i>L. monocytogenes</i> en muestras clínicas .....	26
3.4	Taxonomía de Listeria y características de crecimiento .....	26
3.4.1	Clasificación taxonómica.....	26
3.4.2	Características de crecimiento.....	27
4.	Caracterización del Peligro .....	28
4.1	Listeriosis.....	28
4.2	Relación dosis-respuesta .....	29
5.	Evaluación de la Exposición.....	32
5.1	Ecología de <i>L.monocytogenes</i> .....	32
5.2	Dinámica del <i>L. monocytogenes</i> en la cadena ago-alimentaria .....	33
5.2.1	Producción primaria.....	33
5.2.2	Transformación agroindustrial – Elaboración de queso campesino .....	36
5.2.3	Distribución, comercialización y venta de quesos.....	39
5.2.4	Consumo .....	39
6.	Conclusiones .....	41
7.	Glosario .....	52
8.	SIGLAS.....	54
9.	AGRADECIMIENTOS .....	55
10.	BIBLIOGRAFÍA.....	56
11.	ANEXOS.....	62

## Índice de Tablas

Tabla 1. Principales brotes de Listeriosis asociados al consumo de queso en el mundo 1995-2009 .....	19
Tabla 2. Aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> en muestras de origen clínico reportados por el INS (1991-2010) .....	21
Tabla 3. Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en quesos en el contexto internacional .....	21
Tabla 4. Estudios de prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> en quesos frescos en Colombia (2005-2009).....	22
Tabla 5. Acciones de IVC de queso en Colombia <i>L. monocytogenes</i> en quesos (2000-2009) .....	23
Tabla 6. Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> aislados de alimentos, identificados en el Invima (2000 – 2003) .....	23
Tabla 7. Valores óptimos de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> .....	27
Tabla 8. Descripción epidemiológica y clínica de la Listeriosis en humanos .....	28
Tabla 9. Reportes de listeriosis casos/100.000 habitantes.....	29
Tabla 10. Compilación de modelos dosis-respuesta para <i>L. monocytogenes</i> .....	30
Tabla 11. Límites de crecimiento y sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i> .....	32
Tabla 12. Descripción del proceso de elaboración del queso campesino: producción industrial y artesanal.....	37
Tabla 13. Factores de contaminación y diseminación de <i>L. monocytogenes</i> en la elaboración del queso.....	38
Tabla 14. Reporte de condiciones de uso de algunos agentes utilizados en la industria quesera para la inactivación de <i>L. monocytogenes</i> .....	45

## Índice de Figuras

Figura 1. Muestras de queso positivas para <i>L. monocytogenes</i> distribuidas por departamentos y distritos. (2000-2009).....	24
Figura 2. Serotipos de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de quesos en los departamentos de Antioquia, Nariño y Bogotá D.C (2000-2009) Fuente: Invima , 2010 (4).....	25
Figura 3. Esquematización de la cadena láctea. ....	34

## Índice de Anexos

Anexo 1 Prevalencia de cada uno de los serotipos de <i>L. monocytogenes</i> provenientes de quesos en el periodo 2000 a 2009.....	62
Anexo 2 Muestras de queso procesadas en el Distrito Capital, Antioquia y Nariño con reporte de <i>L. monocytogenes</i> . .....	63
Anexo 3 Características generales de los métodos utilizados para la detección y aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> .....	64
Anexo 4. Método para la enumeración de <i>L. monocytogenes</i> .....	65
Anexo 5. Ficha técnica – Queso Campesino .....	67

## Justificación, Términos de Referencia, Alcance y Objetivos

### Justificación del Gestor del Riesgo

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen un problema de salud pública que puede afectar a toda la población y generar años de vida potencialmente perdidos, donde diversos agentes biológicos, físicos y químicos pueden estar potencialmente involucrados.

*Listeria monocytogenes* es uno de los principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos. Se desarrolla adecuadamente a temperaturas de refrigeración superiores a 3,5°C; esta capacidad le permite mantener la viabilidad en el interior o en las superficies de los alimentos que generalmente se preservan a bajas temperaturas. Se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente y en las superficies de contacto de las plantas procesadoras de alimentos de los alimentos, pudiendo estar presente en el producto mismo.

Se considera un patógeno oportunista con tasas de mortalidad del 20-30%. Todas las cepas de *L. monocytogenes* se consideran patógenas, aunque su virulencia es variable y las manifestaciones clínicas dependerán del estatus inmunológico de cada individuo.

Esta bacteria ha sido asociada a alimentos tales como leche cruda y pasteurizada; quesos (particularmente variedades blandos – madurados); helados y productos cárnicos. Afecta principalmente a los niños, ancianos, mujeres gestantes y personas inmunosuprimidas, ocasionando abortos, meningitis o meningoencefalitis.

Esta bacteria puede ingresar a las plantas de lácteos mediante la tierra proveniente de los zapatos y la vestimenta del personal que labora en las fábricas.

El Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima ) realizó un estudio para la determinación e identificación de *L. monocytogenes* en quesos que se comercializan en Bogotá (1994 – 1995) cuyo resultado evidenció, en quesos frescos, una prevalencia del 26,6%.

Los consumidores esperan que la protección frente a los riesgos tenga lugar a lo largo de toda la cadena agroalimentaria, desde la producción primaria hasta el consumo, para lo cual se requiere que todos los sectores de la cadena actúen de forma integrada. La evaluación de riesgo durante el proceso de producción del queso, permitirá adoptar medidas preventivas para evitar la contaminación por *L. monocytogenes* y permitirá orientar las acciones de Inspección, Vigilancia y Control (IVC), utilizando los recursos de

manera eficiente y protegiendo de esta manera la salud pública, reduciendo el riesgo de ETA.

Nota: de común acuerdo con el gestor se definieron el alcance y el objetivo

### **Alcance**

El estudio se centró en el queso fresco por su mayor prevalencia de *L. monocytogenes*. La zona geográfica se restringió a Bogotá D.C., Antioquia y Nariño. Los datos de prevalencia en queso fresco que se utilizaron en el estudio se limitaron a los años 2000 a 2009. Se consideraron dos grupos de población: riesgo y normal.

### **Objetivo**

Realizar la evaluación cualitativa del riesgo de infección por *L. monocytogenes* por consumo de queso fresco en tres zonas del país (Bogotá, D.C., Antioquia y Nariño) con una visión de cadena productiva en concordancia con el enfoque de la OMS de la “granja a la mesa”.

### **Términos de Referencia**

1. Categorizar los quesos frescos con base en los datos de prevalencia en *L. monocytogenes*.
2. ¿Cuál es el riesgo de enfermar con *L. monocytogenes* por consumo de queso fresco de mayor peligro?
3. ¿Bajo el enfoque de la “granja a la mesa” en qué etapas de la cadena productiva hay mayor riesgo de contaminación por *L. monocytogenes*?
4. ¿Cuáles son las medidas preventivas y de control aplicables a lo largo de la cadena?

## Introducción

*Listeria monocytogenes* es el agente causal de la Listeriosis, una de las enfermedades más importantes adquirida en el 99% de los casos por el consumo de alimentos contaminados. Es una bacteria patógena, de carácter zoonótico y amplia distribución en la naturaleza (agua, suelo, vegetación, entre otros) (5). En el hombre se reconocen dos tipos de Listeriosis: invasiva y no invasiva (1). La primera produce la mayor tasa de hospitalización y de mortalidad (60%-80%) (2), la segunda produce gastroenteritis con baja tasa de hospitalización y mortalidad (3).

*L. monocytogenes* y la Listeriosis fueron reconocidas por primera vez en estudios de laboratorio en animales en 1924 (6). La Listeriosis es una enfermedad que afecta a los humanos y en la década de los ochenta presentó un incremento en el número de casos en varios países, donde la transmisión por el consumo de alimentos contaminados fue completamente establecida (7).

*L. monocytogenes* es un bacilo Gram-positivo capaz de crecer a temperaturas de refrigeración; su control en la industria de alimentos ha resultado complejo debido a la ubicuidad en el medio ambiente (8), así como a la tolerancia a condiciones medioambientales desfavorables como bajos valores de pH, altas concentraciones de cloruro de sodio y su capacidad de formar biopelículas. Lo anterior le permite persistir en equipos y utensilios. Debido a estas razones, puede fácilmente contaminar los productos post-proceso y multiplicarse generando el riesgo de infección al consumidor.

En las últimas dos décadas, en el ámbito mundial, el queso ha sido el principal alimento involucrado en brotes de Listeriosis (9, 10), destacándose los siguientes brotes: el primero, en Estados Unidos asociado al consumo de queso “tipo-mexicano”, con una tasa de mortalidad del 34%(11), el segundo, en Suiza asociado al consumo de queso “*Vacherin Mont d’Or-type*”, con una tasa de mortalidad del 27%, y los dos últimos ocurridos en Francia asociados al consumo de queso *Brie de Meaux* (12). Recientemente en Europa se han presentado otros brotes por lo que los organismos internacionales siguen considerando este microorganismo de alto impacto en salud pública, por lo tanto se requiere desarrollar estrategias de intervención a lo largo de la cadena láctea bajo el enfoque de análisis de riesgos.

El queso en Colombia hace parte de la canasta básica y las normativas que lo regulan son la Resolución 2310 de 1986 y la 01804 de 1989 del Ministerio de Salud (13, 14). Los quesos frescos son elaborados de manera industrial y artesanal, existiendo mayor riesgo de contaminación con *L. monocytogenes* en la producción artesanal debido principalmente a la falta de implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM).

Como consecuencia del impacto de este patógeno en la salud pública y los intereses particulares del Gestor del Riesgo, en el presente estudio se busca realizar la evaluación cualitativa del riesgo de infección por *L. monocytogenes* por consumo de queso fresco en tres zonas del país (Bogotá, D.C., Antioquia y Nariño) con una visión de cadena productiva en concordancia con el enfoque de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de la “*Granja a la mesa*” (13).

## Identificación del Peligro

### 1.1 Brotes Causados Por *Listeria Monocytogenes* En Queso Fresco

Los principales brotes de Listeriosis asociados al consumo de queso reportados en el mundo se presentan en la tabla 1. De los casos incluidos únicamente dos indican que fueron producidos con leche cruda, y se destaca en este resumen la variedad de quesos (incluidos quesos frescos y madurados).

**Tabla 1. Principales brotes de Listeriosis asociados al consumo de queso en el mundo 1995-2009**

Año	Tipo de queso	Nº de afectados	Reporte	Tipo de Listeriosis	Serotipo involucrado	País	Referencia
1995	Queso blando	37	11 muertos (29,7%)	I	4b	Francia	(15)
1997	Queso blando elaborado con leche cruda	14	0	NI	4b	Francia	(16)
2000	Queso fresco tipo mexicano elaborado con leche cruda	13	5 abortos (38,5%)	I	ND	Estados Unidos de Norteamérica	(17)
2001	Queso	48	1 hospitalizado (2,1%)	NI	ND	Suecia	(18)
	Queso	38	0	NI	½ b	Japón	(19)
2002	Queso elaborado con leche cruda	17	Abortos 3 (17,6%) Bacteremia 10 (58,8%) Encefalitis 11 (64,7%) Partos prematuros 2 (11,7%)	I	ND	Canadá	(20)
2005	Queso tomme	10	ND	ND	½ a	Suiza	(21)
2007	Queso suave	21	5 muertos (23,8%) 21 hospitalizados (100%)	I	ND	Noruega	(22)
2006	Queso suave	75	13 muertos (17,3%)		1/2 b	República Checa	(23)
	Queso duro	189	145 (81% hospitalizados) 25 (14% muertos)	I	4b y ½ b	Alemania	(24)
2008	Queso Brie	69	ND	I	Clon 4b	Chile	(25)
2009	Queso duro	14	4 muertos (28,6%)	I	½ b, 4b, ½ a	Austria y Alemania	(26)

ND: no hay dato; I: Listeriosis invasiva; NI: Listeriosis no invasiva

Entre 1995 y 2009, en la literatura disponible, se reportaron en el mundo 11 brotes, con 545 personas afectadas de Listeriosis asociada al consumo de quesos, con tasas de mortalidad entre el 14% y 30% y de hospitalización de hasta el 100%. En la Unión Europea (UE), entre 2004 y 2008, se estimaron 0,3 casos por cada 100.000 habitantes,

este valor es mayor al reportado en años anteriores (0,17/100.000 habitantes) (26,). Para el año 2007, el mayor número de casos se presentó en personas mayores de 65 años (53,1%) estimándose una tasa de 1 caso/100.000 y en niños menores de 5 años con 0,51 casos/100.000 habitantes(27).

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) reportó uno de los brotes de mayor impacto por *L. monocytogenes* en el año 2000 (28), debido al consumo de queso fresco tipo mexicano, elaborado de forma artesanal con leche cruda contaminada. En este brote se reportaron 12 casos, 11 mujeres con edad promedio de 21 años y un hombre de 70 años que desarrolló un absceso cerebral. Del total de mujeres 10 estaban embarazadas, de ellas 5 abortaron, 3 tuvieron parto prematuro y en dos casos, se presentaron infecciones en los neonatos. La tasa de hospitalización fue del 100% (29). En este brote se puede observar que los afectados concuerdan con los grupos de riesgo reportados para la enfermedad. Es importante resaltar que, considerando los hábitos de consumo de las mujeres embarazadas, éstas consumían 2 y 3 porciones por día, aumentando el riesgo de exposición.

En Colombia no hay reportes de brotes de Listeriosis asociadas al consumo de quesos, sin embargo, en 2009, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) reportó un caso con manifestaciones de meningitis en un niño de 9 años debido al consumo de queso fresco (30). El Grupo de Microbiología, de la Red Nacional de Laboratorios del Instituto Nacional de Salud (INS) reportó entre 1991 y 2010 (30 de agosto fecha en la cual se dio inicio al estudio), 158 aislamientos de *L. monocytogenes*, provenientes de diferentes muestras clínicas. El Distrito Capital y los departamentos de Valle y Antioquia, con 98, 35 y 10 aislamientos respectivamente, son los que presentan mayor número de reportes. Los aislamientos se realizaron principalmente a partir de Líquido Cefalorraquídeo (LCR) y hemocultivo, ninguno fue serotipificado (Tabla 2).

**Tabla 2. Aislamientos de *L. monocytogenes* en muestras de origen clínico reportados por el INS (1991-2010)**

Lugar	Número de aislamientos	Procedencia muestra			
		Hemocultivo	LCR	MF	Líquido amniótico
Antioquia	10	2	7	1	
Arauca	1	1			
Bogotá	91	37	51	1	2
Bolívar	1		1		
Boyacá	1		1		
Caldas	3	2	1		
Meta	2	2			
Nariño	2		2		
Risaralda	8	2	5	1	
Santander	5	2	3		
Valle	34	27	7		
<b>Total</b>	<b>158</b>	<b>75</b>	<b>78</b>	<b>3</b>	<b>2</b>

Adaptado de Grupo de Microbiología, RNL, INS, programa de vigilancia por laboratorios 2010. LCR: líquido cefalorraquídeo, MF: materia fecal

## 1.2 Prevalencia de *L. Monocytogenes* en quesos

En la Tabla 3 se presentan estudios realizados en el ámbito internacional sobre la presencia de *L. monocytogenes* en quesos. La prevalencia varía entre 0% y 50%, sin embargo esta variabilidad puede estar relacionada con el número de muestras procesadas en cada estudio, así como las condiciones de elaboración de los mismos. (Uso de leche cruda o pasteurizada y tipo de queso).

**Tabla 3. Prevalencia de *L. monocytogenes* en quesos en el contexto internacional**

Tipo de Queso	Año	Nº de muestras analizadas	Prevalencia (%)	País	Referencia
Queso fresco artesanal		17	41,2		
Queso fresco industrial	NR	33	3,0	Brasil	(31)
Queso madurado		53	5,7		
Queso fresco	2007	110	24,5	Costa Rica	(32)
Queso fresco	NR	101	22,8	México	(33)
Queso fresco	NR	10	10,0	Costa Rica	(34)
Quesos de pasta blanda (tipo panela hecho con leche pasteurizado) y queso semimadurado (Chihuahua)	2005	60	0	México	(35)
Queso fresco	NR	60	3,3	Venezuela	(36)
Queso fresco	NR	25	0	Chile	(37)
Queso fresco artesanal	2003	74	4,1	Perú	(38)
Queso suave	NR	99	1,0	España	(39)
Queso fresco Queso elaborado con	20002001	371	1,6	Portugal	(40)

Tipo de Queso	Año	Nº de muestras analizadas	Prevalencia (%)	País	Referencia
leche pasteurizada		50	4,0		
Queso de pasta blanda	2002-2003	132	0	Argentina	(41)
Quesos semiduros	NR	54	1,9	Cuba	(42)
Quesos semisuaves, incluidos 36 quesos frescos	2001-2002	90	6,7	Brasil	(43)
Queso telita	NR	100	0	Venezuela	(44)
Queso minas	NR	40	0	Brasil	(45)
Queso tipo colonial	2004-	62	0	Brasil	(46)
Queso ricotta	2005	6	50,0		
Queso panela	NR	40	15,0	México	(47)

NR: no reporta

### En el contexto nacional

En Colombia se han adelantado varios estudios de prevalencia de *L. monocytogenes* en leche cruda bovina y queso. En 1994 se reportó una prevalencia de 34% en leches crudas y de 2% en leches pasteurizadas en la zona cundiboyancense (48). En 2007 se reportó, en 200 muestras analizadas, una prevalencia de *L. monocytogenes* del 3% en leche cruda en Norte de Santander (49), y en 2009, en 81 muestras analizadas, la prevalencia fue del 25,9% en Boyacá (50), estableciendo la presencia del microorganismo en la leche cruda. En la Tabla 4 se presentan los datos de *L. monocytogenes* aisladas de quesos frescos reportados en algunos estudios de investigación.

**Tabla 4. Estudios de prevalencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos en Colombia (2005-2009).**

Producto	Lugar	Muestras analizadas (n)	<i>L. monocytogenes</i> (%)	Referencia
Queso blanco	Antioquia	172	57 (33,1%)	(51)
Queso blanco artesanal	Cundinamarca (Cáqueza)	30	(13,3%)	(52)
Queso fresco	Norte de Santander (Pamplona)	74 Doble crema	5 (6,75%)	(53)
		83 queso de hoja	5 (6,02%)	
		28 cuajada	1 (3,57%)	
Queso costeño	Córdoba (Montería y Cereté)	217	0 (0)	(54)

En 2010, la Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos (UERIA) recolectó y consolidó los resultados de las acciones de inspección, vigilancia y control de once direcciones territoriales de salud del país. Estos reportes incluían 3.700 muestras de queso analizadas para *L. monocytogenes* en el periodo 2000-2009, de las cuales el 18,78% resultaron positivas para este patógeno. De estas muestras el 96% corresponde a queso fresco tipo campesino (55).

**Tabla 5. Acciones de IVC de queso en Colombia *L. monocytogenes* en quesos (2000-2009)**

Periodo 2000 – 2009	Muestras analizadas	Positivas para <i>L. monocytogenes</i>	Prevalencia
<b>Total Queso Fresco 11 DTS</b>	<b>3494</b>	<b>643</b>	<b>18,40 %</b>
Queso Fresco Distrito Capital	2420	359	14,83 %
Queso Fresco Antioquia	435	178	40,92 %
Queso Fresco Nariño	214	9	4,21 %

Fuente: UERIA 2010 (55)

De acuerdo con los datos recopilados de los departamentos de Antioquia, Bogotá, Caldas, Córdoba, Cundinamarca, Nariño, Norte de Santander, Quindío, Risaralda, Valle y Vichada la prevalencia de *L. monocytogenes* para queso fresco fue de 18,40%, donde la mayor prevalencia se presentó en el departamento de Antioquia (55) .

Es importante señalar que en Colombia la legislación actual no establece la obligatoriedad de la vigilancia de *L. monocytogenes* en queso fresco, sin embargo, el Invima, como institución competente del direccionamiento para la red de laboratorios en alimentos, y las direcciones territoriales de salud, realizan la búsqueda del patógeno dentro de sus programas de IVC.

En cuanto a los serotipos de *L. monocytogenes* circulantes en Colombia, son pocos los reportes oficiales debido a que la única entidad que realiza la serotipificación es el Laboratorio Nacional de Referencia del Invima, de muestras procedentes de los Laboratorios de la red nacional de salud pública. En el período comprendido entre 2000 y 2003, se serotipificaron un total de 294 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos, donde se encontró que el serotipo 4b fue predominante (Tabla 5).

**Tabla 6. Serotipos de *L. monocytogenes* aislados de alimentos, identificados en el Invima (2000 – 2003)**

Serotipo*	Cantidad	Porcentaje
½ a	6	2,04
½ b	21	7,14
½ c	19	6,46
3 <sup>a</sup>	1	0,34
3b	7	2,38
4 <sup>a</sup>	1	0,34
4b	217	73,81
4c	5	1,70
4d – 4c	17	5,78
Total	294	100

Fuente: Invima , 2010 (4).

\* Confirmados en cooperación Internacional por el *National Reference Centre for Listeria, Institut Pasteur*.

La selección del tipo de queso para esta evaluación se realizó con la información de la prevalencia de los serotipos de *L. monocytogenes* suministrada por el Invima ) para el período 2000- 2009 (4) (Anexo 1). Esta información también coincide con la información recolectada y consolidada por la UERIA en 2010 relacionada con las acciones de IVC de las direcciones territoriales de salud. (Anexo 2) (55). Es importante aclarar que algunos tipos de quesos se podrían encontrar clasificados inapropiadamente, tal como el reportado como “queso pasteurizado”, de igual forma no aparecen datos sobre el “quesito antioqueño” en el departamento de Antioquia siendo éste el de mayor producción en la zona (Figura 1).

Con los datos disponibles, el queso campesino aparece como el que presenta mayor prevalencia de *L. monocytogenes*. Con esta información se estableció que las zonas geográficas objeto de este estudio fueran Antioquia, Nariño y el Distrito de Bogotá por ser las que presentan mayor número de aislamientos de *L. monocytogenes*.

En la figura 2, se muestran los serotipos de *L. monocytogenes* de muestras de quesos provenientes de los departamentos de Antioquia, Nariño y el Distrito Capital, donde el serotipo predominante es el 4b.

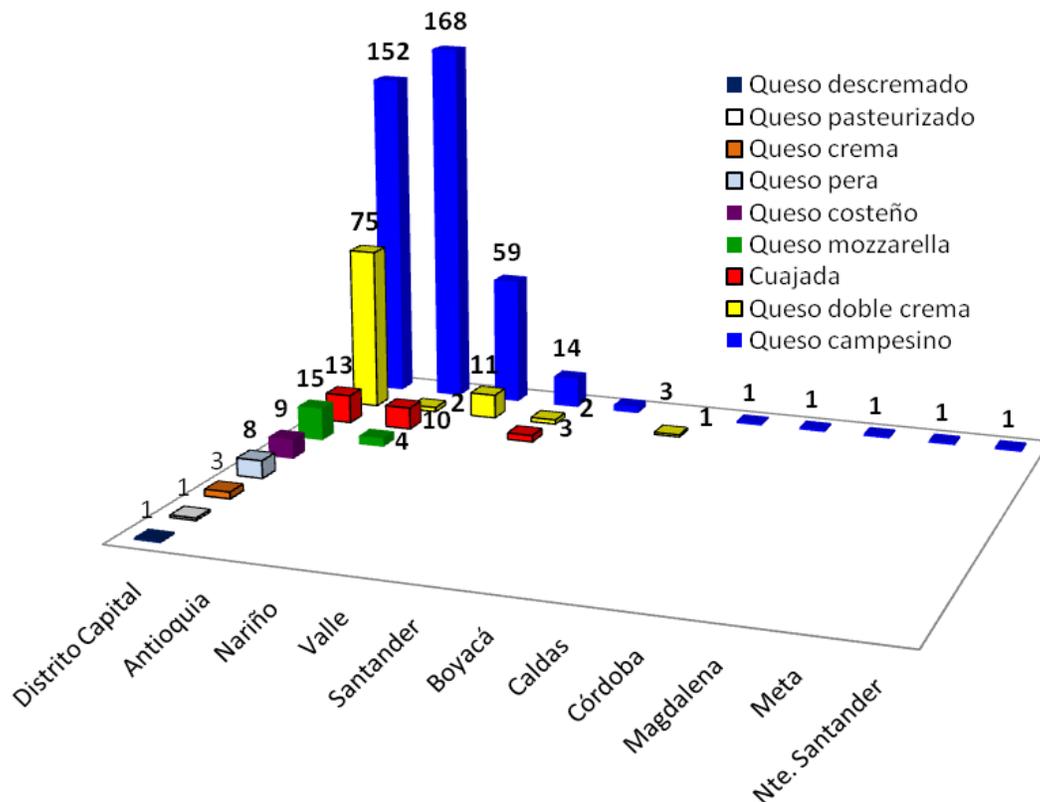


Figura 1. Muestras de queso positivas para *L. monocytogenes* distribuidas por departamentos y distritos. (2000-2009)

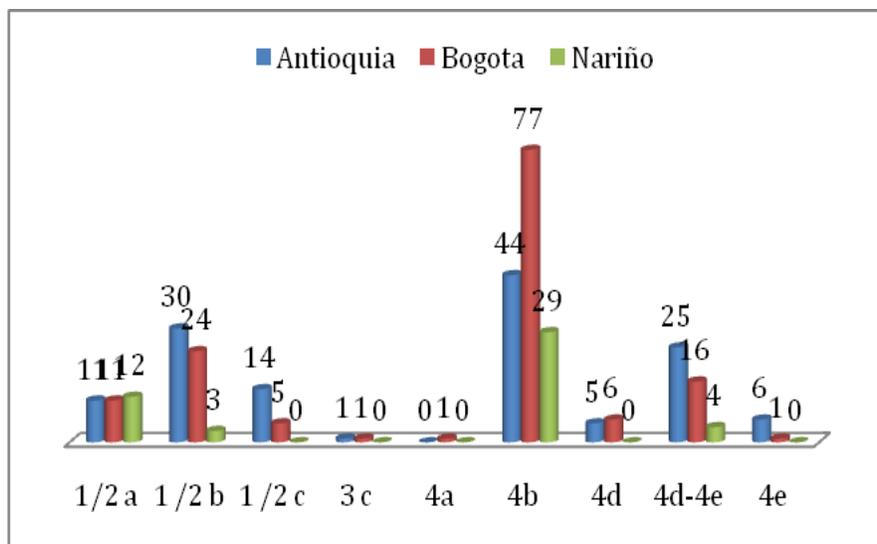


Figura 2. Serotipos de *L. monocytogenes* aisladas de quesos en los departamentos de Antioquia, Nariño y Bogotá D.C (2000-2009) Fuente: Invima , 2010 (4)

### 1.3 Métodos de identificación y detección de *L. Monocytogenes*

#### 1.3.1 Métodos de identificación y detección de *L. monocytogenes* en muestras de queso

Los dos métodos de mayor reconocimiento internacional para la identificación de *L. monocytogenes* en alimentos son el método de la Agencia de Medicamentos y Alimentos (FDA) descrito en el “Bacterial Analytical Manual” (BAM) (56) y la norma ISO 11290; también se encuentra el método AOAC/IDF 993.12 recomendado para derivados lácteos (57).

Dichas técnicas se basan en un preenriquecimiento, un enriquecimiento y posterior aislamiento en medios de cultivo diseñados para la recuperación del microorganismo (Agar Palcam, agar Ottaviani-Agosti -Agar ALOA-, agar Oxford, agar MOX,) y la posterior caracterización bioquímica. Los métodos oficiales incluyen técnicas de aislamiento microbiológico, con una sensibilidad de detección de 1 célula/25 g del alimento analizado, equivalente a 0,04 UFC/g. La sensibilidad de esta técnica se optimiza con el uso de medios de enriquecimiento, usualmente mediante la utilización de antibióticos que inhiben otros microorganismos competidores (56, 58).

En Colombia, el Invima incluye en su Manual de Métodos Microbiológicos (59) la técnica de Ausencia/Presencia basada en el método propuesto en el BAM. Actualmente existen otras metodologías que son ampliamente utilizadas debido a que reducen el tiempo de análisis de la prueba. Entre ellas se destacan los métodos inmunológicos y moleculares

debido a que se obtienen resultados en 48 h. (En el anexo 3 se presentan en detalle los diversos métodos utilizados actualmente). En países de la Comunidad Europea el método utilizado es el recuento en placa, siguiendo el protocolo de la norma ISO 11290-2 (Anexo 4) (60).

### **1.3.2 Métodos de detección de *L. monocytogenes* en muestras clínicas**

El diagnóstico de *L. monocytogenes* en humanos, se hace en diversas muestras de origen clínico como Líquido Cefalorraquídeo (LCR), sangre y líquido amniótico, entre otros. Para el caso de LCR, el Ministerio de Sanidad de España indica que debe realizarse previamente un estudio macroscópico del líquido que puede ser claro o ligeramente opalescente y en el estudio citológico presentar menos de 1.000 células/mm<sup>3</sup> con un porcentaje significativo de linfocitos (61). Posteriormente, se hace una coloración de Gram en búsqueda de bacilos Gram positivos, un cultivo en medio sólido y su correspondiente identificación por métodos automatizados microbiológicos o mediante PCR (62). Adicionalmente, se hace la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos; actualmente se acepta el método NCLS M-45 (63).

Para el estudio de brotes es importante realizar el aislamiento del microorganismo a partir de muestras clínicas y en el alimento sospechoso mediante los métodos descritos anteriormente, y posteriormente, deberán usarse técnicas moleculares para establecer la posible asociación entre las cepas de origen clínico y las aisladas a partir del alimento.

## **1.4 Taxonomía de Listeria y características de crecimiento**

### **1.4.1 Clasificación taxonómica**

El género *Listeria* incluye las especies *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. rocourtiae*, *L. marthii* (64, 65) y *L. gravi*. Esta última especie es la más distante evolutivamente dentro del género. *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* son considerados patógenos en mamíferos (66). *L. monocytogenes* puede ser ubicuo en el medio ambiente de las plantas procesadoras de alimentos (67). Se han detectado 13 serotipos de *L. monocytogenes*, sin embargo más del 90% de los casos de infección alimentaria son causados por los serotipos 1/2a, 1/2b 1/2c y 4b (68-71). A la fecha, se han reconocido 4 linajes (66).

Estudios recientes sugieren que existe una asociación entre los serotipos encontrados en los alimentos y los casos reportados de Listeriosis en humanos (66). También se ha relacionado la condición inmunológica de los individuos y los serotipos (72).

#### 1.4.2 Características de crecimiento

Las características más importantes de esta bacteria incluyen la habilidad para crecer a temperaturas de -1,5-45°C, valores de pH reportados de 4, 0-9,6 (73, 74) y de 4,2-9,5 (75) y actividades de agua ( $a_w$ ) superiores a 0,92 (67, 76). Los valores óptimos de crecimiento se muestran en la tabla 6.

**Tabla 7. Valores óptimos de crecimiento de *L. monocytogenes***

<b>Parámetro</b>	<b>Óptimo</b>
Temperatura	30-37 °C
pH	7,0
Actividad de agua ( $a_w$ )	0,97

Fuente: FSAI, 2005(75).

## Caracterización del Peligro

### 1.5 Listeriosis

*L. monocytogenes* produce dos tipos de Listeriosis por el consumo de alimentos: invasiva y no invasiva. Adicionalmente, la infección en humanos puede ser de tipo ocupacional (ejemplo: ordeñadores, médicos veterinarios y zootecnistas). Los mayores grupos de riesgo de Listeriosis son mujeres embarazadas, personas mayores de 65 años, neonatos (hasta 4 semanas) y pacientes con alguna deficiencia inmunológica (pacientes trasplantados, con leucemia, portadores de VIH, diálisis, pacientes con cáncer, enfermedades hepáticas, diabetes, alcoholismo) (7) que pueden llegar al 20% de la población total (9, 77, 78). En la tabla 7 se muestra un resumen de las características de cada grupo.

**Tabla 8. Descripción epidemiológica y clínica de la Listeriosis en humanos**

Tipo de Listeriosis	Modo de transmisión	Severidad	Periodo de incubación	
Listeriosis invasiva	Infección neonatal temprana	Infección de neonatos durante el parto o por contaminación cruzada con neonatos en salas de recién nacidos	Puede ser extremadamente severa, resultando en meningitis y muerte (mortalidad de hasta 35%).	1-2 días (incubación temprana) habitual en la infección congénita previa al nacimiento. 5-12 días en el caso de contaminación con otros neonatos.
	Infección neonatal tardía	10-15% de los casos neonatales transferencia en el canal vaginal.	Involucra períodos febriles, meningitis, en algunos casos diarrea y neumonía, (mortalidad de 13-43% en pacientes tratados y 100% de mortalidad en pacientes no tratados <sup>1</sup> ).	1-8 semanas postparto.
	Durante el embarazo (prenatal)	Adquirida por el consumo de alimentos contaminados	Enfermedad leve, asintomática para la madre (afección respiratoria leve o moderada). Serias implicaciones para el feto incluyendo: aborto espontáneo, muerte del feto, mortinato y meningitis. Es más común en el tercer trimestre. La mujer puede portar el microorganismo en el tracto genital por algún tiempo, ocasionando complicaciones en embarazos posteriores.	De uno a varios días, incluso semanas.
	adultos mayores de 65 años, inmunosuprimidos	Adquirida por el consumo de alimentos contaminados	Puede evolucionar a enfermedades del sistema nervioso central incluida meningitis. Tasa de mortalidad puede llegar al 80%.	De 1 día a 3 meses con un promedio de 20-30 días.
Listeriosis no invasiva	Consumo de alimentos contaminados con concentraciones elevadas de <i>L. monocytogenes</i> (10 <sup>7</sup> UFC/g).	Vómito, diarrea, fiebre, náuseas, dolor de cabeza y fatiga puede evolucionar a bacteriemia, suele ser auto-limitante. No genera complicaciones. La información sobre los mecanismos que utiliza <i>Listeria</i> para desarrollar la enfermedad no se han logrado establecer <sup>2</sup>	< 24 horas después del consumo.	

Fuente: Slukstker et al.,1999; Farber et al.,1991 (73, 79)<sup>1</sup> - McLauchlin et al.,2004 (67)<sup>2</sup>

Las tasas de mortalidad para la Listeriosis invasiva pueden variar del 10% al 80%, sin embargo, se estima que la tasa de mortalidad global es del 30% (5). El período de incubación puede variar de 1-90 días (71).

En la tabla 8 se muestran los datos de incidencia de Listeriosis por cada 100.000 habitantes en varios países. En Colombia no se cuenta con esta información.

**Tabla 9. Reportes de listeriosis casos/100.000 habitantes**

País	Número de casos/100.000 habitantes	Año	Referencia
Estados unidos	12 en neonatos	1997	(80)
España	1,8 general	2000	(81)
Estados unidos	12 en inmunocomprometidos	2000	(82)
Francia	0,35 general	2001-2003	(12)
Estados Unidos	0,3 población general	2005	(29)
Dinamarca	1,8 general	2009	(83)
Alemania	0,62 general	2009	(24)

Con base en los datos de la evaluación de riesgo de 2001 de FDA/USDA (84) un consumidor promedio ocasionalmente puede consumir entre  $10^6$  a  $10^9$  UFC de *L. monocytogenes* en una única comida. A pesar de esta alta exposición únicamente se reportan en Estados Unidos 2.500 casos anuales de Listeriosis en humanos, lo cual indica que posiblemente la exposición a estas concentraciones del microorganismo en población general, pueden no causar enfermedad (85).

No obstante, algunos autores han descrito que personas que sufrieron Listeriosis consumieron 2 a 3 porciones del alimento contaminado en un período corto (menor 24 horas), aumentado el número de microorganismo ingerido alcanzando la dosis mínima infectante (28).

### 1.6 Relación dosis-respuesta

Se han publicado varios modelos de dosis/respuesta en *L. monocytogenes* (3, 66, 67, 78, 82, 84-90) (Tabla 9). Los modelos de relación dosis respuesta tienen en cuenta principalmente los siguientes puntos:

- a. La virulencia del microorganismo: se estima que entre el 1-10% de las cepas de *L. monocytogenes* son virulentas. Se han encontrado diferencias en la virulencia de cepas de *L. monocytogenes* procedentes de alimentos. (86).
- b. La susceptibilidad del hospedero: Hay diferencias sustanciales en susceptibilidad entre las poblaciones de bajo y alto riesgo (3). La dosis para grupos de riesgo se estima en  $10^3$  UFC/g (7) y en  $10^7$  UFC/g para población normal (73).

- c. Influencia de la matriz de alimento: En el caso del queso, los glóbulos de grasa de la leche pueden favorecer la sobrevivencia de *L. monocytogenes* (88).

**Tabla 10 Compilación de modelos dosis-respuesta para *L. monocytogenes***

Referencia	Base empírica	Modelo usado	Dosis Infecciosa/Dosis Letal Reportada
(89)	Comparación de datos epidemiológicos con estudios previos en ratones Audurier, 1980; Donnelly, 1990 (90, 91).	Beta-Poisson	Dosis infecciosa de $10^6$ - $10^{11}$ UFC/g. Se asume que la afecta a la población normal.
(92, 93)	Ratones (Exposición Oral e Intravenosa)	Exponencial	Dosis infecciosa $DI_{50}$ para exposición intravenosa varía entre $10^{0.8}$ y $10^{1.8}$ UFC/g y para exposición oral entre $10^{6.5}$ a $10^{7.9}$ . Dosis letal $DL_{50}$ para exposición intravenosa varía entre $10^{3.2}$ y $10^{5.8}$ y por exposición oral es $> 10^9$ .
(86)	Subjetivo	Weibull-Gamma	Dosis infectiva $DI_{50}$ reportada para población de alto riesgo es de $7\text{Log}_{10}$ y para población normal de $9\text{Log}_{10}$ .
(94)	Muerte fetal inducida en primates. Exposición oral	Log-Logistic	Dosis letal $DL_{50}$ reportada es de $10^7$ UFC/g.
(95)	Mortalidad fetal en hembras preñadas de cobayos y primates. Exposición oral	Logístico	Dosis letal $DL_{50}$ reportada para cobayos y primates es de $10^7$ UFC/g.
(96)	Hembras preñadas de cobayos. Exposición Oral	Log-Logístico	Dosis letal $DL_{50}$ de los fetos reportada es de $10^7$ UFC/g.
(97)	Epidemiológico (Datos de EEUU obtenidos de Foodnet y basados en 8 productos de alimentos listos para consumo)	Exponencial	Dosis en las que se reportaron infecciones, entre $10^2$ y $10^5$ UFC/g.
(78, 98)	Epidemiológico (Datos de Alemania de incidencia de Listeriosis y prevalencia en pescado ahumado)	Exponencial	La dosis mínima que causó Listeriosis fue de $10^4$ UFC/g.
(78)	Epidemiológico (Brote ocasionado por mantequilla en Finlandia en pacientes inmunosuprimidos)	Exponencial	No reportada. Las muestras analizadas reportaron entre $10^1$ y $10^3$ UFC/g de contaminación por <i>L. monocytogenes</i> .
(77)	Epidemiológico (Datos obtenidos de Suecia)	Exponencial y Weibull Gamma	La dosis media ingerida predicha fue de $10^4$ UFC/g.
(67)	Revisión de estudios de 1980 a 1994, realizados en ratones, curies, ratas y monos. Presenta también datos epidemiológicos de brotes.	Exponencial	Las dosis ingeridas reportadas que causaron diversos síntomas de Listeriosis están entre un rango de $10^1$ y $10^7$ UFC/g en humanos. Los datos de dosis más bajas se presentaron en grupos de pacientes inmunosuprimidos. Las dosis altas corresponden a población general. Las dosis infecciones $DL_{50}$ y letales $DL_{50}$ en animales varían entre $10^2$ y $10^9$ UFC/g para exposiciones orales e intravenosas.
(3)	Estudios previos de Buchanan, 1997; Lindqvist, 2000 (77, 78)	Múltiple	Dosis Letal reportada en humanos $DL_{50}$ de aproximadamente $10^6$ UFC/g para población general.
(81)	Combinación de datos epidemiológicos y estudios previos	Múltiple	Dosis Letal reportada en humanos $DL_{50}$ de aproximadamente $10^{13}$ UFC/g en población general. $10^9$ UFC/g en neonatos y Aproximadamente $10^{11}$ UFC/g en personas de la tercera edad.

Por lo anterior, las relaciones entre dosis-respuesta se han desarrollado y evaluado basándose principalmente en datos epidemiológicos y/o estudios con animales. Es importante aclarar que con los modelos animales, los datos no pueden extrapolarse a humanos ya que con las mismas dosis, el efecto en éstos puede ser más letal. No obstante esta dificultad y debido a que no pueden realizarse ensayos en humanos, se ha aceptado el uso de estos modelos.

## Evaluación de la Exposición

### 1.7 Ecología de *L.monocytogenes*

En la tabla 10 se presentan las características generales de crecimiento de *L. monocytogenes*.

**Tabla 11. Límites de crecimiento y sobrevivencia de *L. monocytogenes***

Parámetro	Mínimo	Máximo	Sobrevivencia
Temperatura	-1,5 a 3 °C	45 °C	-18 °C
pH	4,0	9,4-9,6	3,3-4,0
Actividad de agua ( $a_w$ )	0,90 a 0,93	>0,99	<0,89
Sal (% NaCl)	< 0,5	12-16	> 20

N/A: no aplica Adaptado: (3, 67, 73-75, 99, 100)

Entre los factores que afectan al crecimiento de *L. monocytogenes* está la temperatura, pH, actividad de agua ( $a_w$ ) y concentración de solutos en el medio.

- Temperatura: *L. monocytogenes* puede crecer en un amplio rango de temperaturas. Esto indica que las temperaturas de refrigeración comúnmente usadas para conservar el queso campesino (4-6°C) no contribuyen a prevenir el desarrollo de *L. monocytogenes* (101, 102).
- pH: El crecimiento de *L. monocytogenes* se ve inhibido por valores de pH inferiores a 4,0 (73, 74). En el caso del queso campesino elaborado industrialmente su pH varía entre 6,2-6,6, en los quesos artesanales puede bajar a 5,6. Sin embargo en ninguno se inhibe el desarrollo de *L. monocytogenes* (99, 103).
- Actividad de agua: El queso campesino varía su  $a_w$  entre 0,96-0,98, condición que favorece el crecimiento de *L. monocytogenes* (104).
- Concentración de solutos: *L. monocytogenes* es resistente a condiciones de osmolaridad altas, puede sobrevivir en alimentos con concentraciones de sal de hasta el 18% (105), por lo tanto la concentración de sal del queso campesino (1,5%) no inhibe su crecimiento, más si lo retarda.
- Atmósfera modificada: *L. monocytogenes* es un microorganismo anaerobio facultativo, por lo tanto el uso de atmósferas modificadas (75:25, CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub> y 72,5:22,5:5, CO<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>) no inhibe su crecimiento (106, 107). El empaque al vacío en el queso campesino no inhibe el crecimiento del microorganismo.

## 1.8 Dinámica del *L. monocytogenes* en la cadena agro-alimentaria

El enfoque de cadena agro-alimentaria, permite garantizar la inocuidad y la calidad bajo el planteamiento “*de la granja a la mesa*”, por esto es necesario el entendimiento de la ecología microbiana y la dinámica de *L. monocytogenes* en cada uno de los eslabones de la cadena láctea. En la figura 3 se muestra el esquema de la cadena productiva láctea, desde la producción primaria hasta el consumo final.

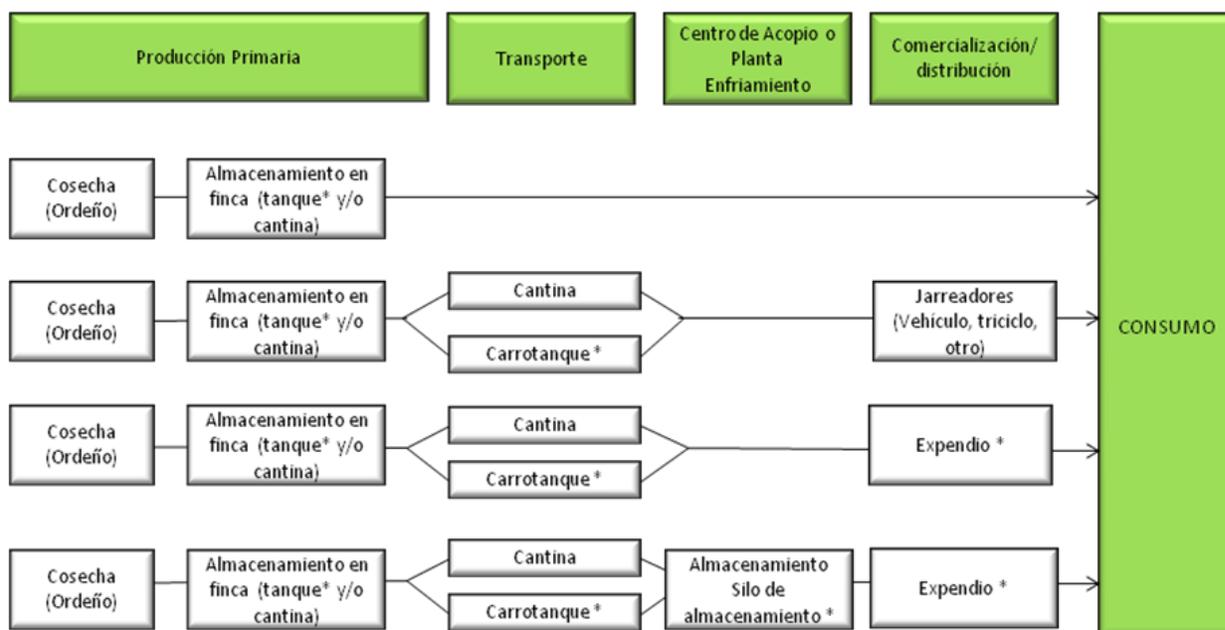
### 1.8.1 Producción primaria

Muchas especies animales pueden infectarse con *L. monocytogenes*, aunque la enfermedad clínica es más frecuente en rumiantes (108). Se ha demostrado que hasta el 50% de muestras de materia fecal de animales asintomáticos (bovinos, ovejas, cabras, cerdos y aves de corral) pueden ser positivos al aislamiento de *L. monocytogenes* (109). El escenario de transmisión de *L. monocytogenes* en las granjas se inicia con la contaminación del suelo y cosechas, por animales silvestres o heces utilizadas para fertilizar el campo (109). Adicionalmente, debido a su considerable resistencia a condiciones medioambientales, la *L. monocytogenes* es capaz de multiplicarse y sobrevivir por extensos períodos de tiempo (dos años o más) fuera de hospederos mamíferos, facilitando de esta forma su diseminación (109, 110).

La contaminación del ensilaje por *L. monocytogenes* representa una fuente importante de contaminación para los rumiantes. El ensilaje con un contenido alto de humedad (de un 50% o más) puede dar origen a procesos inapropiados de fermentación en los cuales *Listeria* spp. puede sobrevivir (111). No se conoce si los rumiantes son hospederos definitivos o contribuyen ecológicamente a la sobrevivencia del microorganismo o a su dispersión en el medio ambiente (109).

En casos esporádicos puede ocurrir una transmisión directa de *L. monocytogenes* de animales a humanos, lo cual puede constituir una fuente de contaminación para la leche. Estudios de epidemiología molecular han permitido establecer que dependiendo del tipo de explotación (pastoreo o estabulación), las cepas aisladas de casos clínicos están relacionadas con cepas aisladas de vacas asintomáticas en algunos casos y en otros con cepas medioambientales (109, 112).

De igual forma, *L. monocytogenes* ha sido aislada en bovinos y ovinos con mastitis subclínica, donde las leches se caracterizan por tener elevados recuentos de células somáticas y apariencia normal. Dentro de un hato el nivel de infección puede ser bajo pero constante (113).



**Figura 3. Esquematización de la cadena láctea.**

La mayoría de autores sugieren que los animales pueden infectarse con *L. monocytogenes* por vía hematógena o intramamaria. Para prevenir la infección de humanos se requiere mantener una estricta higiene, adicionalmente, en los hatos debe realizarse la prueba de California Mastitis Test (CMT) con el objeto de detectar la inflamación de la glándula mamaria como indicativo de presencia de mastitis (113, 114).

Los serotipos de *L. monocytogenes* comúnmente asociados con la enfermedad de humanos (4b and 1/2a) han sido aislados en hogares de zonas rurales de áreas lecheras (115). El contacto de personas en las áreas rurales con materia fecal, suelo, agua, y alimento, puede resultar en la contaminación de zapatos, guantes, ropa y manos (115). En estas áreas el microorganismo también se ha aislado de lavadoras, neveras y vertederos por lo cual debe darse especial atención a la higiene en el hogar. Algunas medidas como no ingresar con calzado de trabajo a la casa, dejar los guantes en las áreas de trabajo y tomar especiales precauciones en la cocina pueden ayudar a reducir la presencia del microorganismo en el ámbito rural (115).

#### **a. Ordeño**

La leche se puede contaminar por diversos factores como el deterioro de la infraestructura, pisos húmedos o dañados, funcionamiento inapropiado de equipos o higiene deficiente en los mismos, factores que en la mayoría de los casos favorecen la formación de biopelículas. El lavado deficiente de la ubre y/o los pezones, agua de mala

calidad microbiológica, así como fallas en las prácticas de higiene durante el ordeño por parte de los operarios son otros aspectos que pueden favorecer la contaminación (116-118). El microorganismo también ha sido aislado de las manos de operarios de granjas, por lo cual esta fuente de contaminación no puede ser descartada (115).

Se considera que el ordeño mecánico aumenta la posibilidad de diseminación de *L. monocytogenes* al propiciar la formación de biopelículas, debido a su habilidad para adherirse a las superficies de acero inoxidable, además, cuando los programas de limpieza y desinfección se hacen de manera incorrecta se puede favorecer la presencia de la bacteria en leche (119). La bacteria ha sido detectada en los filtros de leche, aunque se requiere realizar estudios para cuantificar la importancia de las biopelículas en esta etapa. Prevenir la formación de biopelículas en equipos de ordeño es por lo tanto una etapa crucial para garantizar leche con condiciones apropiadas de inocuidad (119, 120).

#### **b. Almacenamiento en cantina o tanque**

Una vez la leche es obtenida en las fincas, es almacenada en cantinas o tanques de enfriamiento. Adicionalmente, en Colombia los tanques pueden guardar leche de varios hatos, constituyéndose en un acopio. Numerosos estudios han detectado la presencia de *L. monocytogenes* en la leche de tanques y cantinas, por tal razón la leche se considera una de las fuentes más importantes para la contaminación de los quesos (121, 122). La contaminación en esta etapa puede provenir del ordeño o directamente de las cantinas o los mismos tanques. La presencia de depósitos de agua, materia orgánica, temperaturas frías y deficiencia en los procesos de limpieza y desinfección de los tanques de enfriamiento, puede proveer condiciones favorables para la sobrevivencia y desarrollo de *L. monocytogenes* (119, 120).

Antognoli *et al.* 2009 correlacionaron algunas variables con la presencia de *L. monocytogenes* en tanques de almacenamiento, encontrando que en los hatos abiertos, se aumenta el riesgo de contaminación y que el almacenamiento del estiércol en zonas alejadas disminuye el riesgo de contaminación (por reducción del riesgo de contaminación de los animales) (122). Los autores también encontraron que en hatos de más de 500 animales aumentaba el riesgo de contaminación de los tanques por este microorganismo (123).

Debido a la naturaleza psicotrófica de *L. monocytogenes*, el número de microorganismos puede incrementarse cuando la leche es almacenada en refrigeración durante largos periodos. En estudios realizados por Donnelly & Briggs, 1986 citados por Lake *et al.*, 2005 en leche fresca en un período de 48 horas, se reporta a 4°C un aumento de 1,5 UL y a 10°C se observó un incremento de 6 UL (118), por tal razón debe darse importancia a la temperatura y al tiempo de almacenamiento.

### **c. Acopio de la leche/ Transporte:**

El acopio de la leche puede llevarse a cabo de tres formas: a) en la finca, cuando en un tanque se recoge la leche proveniente de varios hatos, b) en el transporte cuando leches de varias explotaciones son recogidas directamente en carro tanque o c) en un centro de acopio o directamente en la planta de procesamiento cuando son llevadas directamente allí por parte del productor.

En esta etapa el riesgo de contaminación por *L. monocytogenes* es similar al descrito en la etapa anterior para tanques de enfriamiento. Debe considerarse en esta etapa el mantenimiento de la temperatura de refrigeración y el tiempo de almacenamiento.

### **1.8.2 Transformación agroindustrial – Elaboración de queso campesino**

El queso fresco es definido por la Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud como un “producto higienizado sin madurar, que después de su fabricación está listo para el consumo” (13). El queso campesino es un queso fresco, no ácido y elaborado con leche de vaca, sin maduración, que puede ser prensado o simplemente moldeado, blando, con porcentaje de humedad alto y sabor ligeramente salado (124).

El queso campesino tiene diferentes denominaciones o nombres de acuerdo a la región en donde se elabora: paisa, de ojo, de granja, de prensa, fresco y sabanero, y gran variedad de formas según la zona donde se fabrique. El producto es de color blanco, de apariencia brillante y algo rugosa y textura semiblanda (124, 125).

En el anexo 5 se muestra la ficha técnica del queso campesino. El pH de este queso varía entre 6,2 y 6,6 y el  $a_w$  es de 0,98, estos parámetros no inhiben el crecimiento de *L. monocytogenes*. La vida útil del queso campesino elaborado en forma industrial y empacado al vacío es de 18 a 21 días y en el queso artesanal es de 1 semana.

#### **a. Descripción del proceso**

El queso campesino, de acuerdo con los datos de IVC del Invima para quesos frescos y madurados durante el período 2000 - 2009 fue el que presentó mayor prevalencia de *L. monocytogenes*.

En la Tabla 11 se muestran las etapas del proceso de producción del queso campesino para la elaboración industrial y artesanal indicando los parámetros de proceso. Cabe aclarar que en el proceso artesanal se pueden presentar diversos factores que propician la proliferación de *L. monocytogenes* como se discutirá más adelante.

**Tabla 12. Descripción del proceso de elaboración del queso campesino: producción industrial y artesanal**

<b>Etapas proceso industrial</b>	<b>Descripción de parámetros de proceso industrial</b>	<b>Descripción parámetros de proceso artesanal</b>
Recepción de la leche	Acidez 0,13 – 0,17 % de ácido láctico pH: 6,6 – 6,8 Grasa: 3,4 – 4,5 % Filtración en línea y centrifugación	Acidez 0,13 – 0,17 % de ácido láctico  Filtración por filtro de paso
Estandarización	Grasa: 2,8 – 3,0 %	Separación de la grasa por cuchareo, no hay estandarización
Pasteurización	Temperatura/tiempo 72 °C/15seg o 63 °C/30 min	Temperatura/tiempo 63 °C/30 min en tina
Traslado de la leche	Por tubería Temp: 32°C Tiempo: 5 min	N.A.
Ajuste de temperatura	Temp: 32°C Tiempo: 30seg – 6 min	Temp. 32°C Tiempo: 3 horas
Adición cloruro de calcio	0,1 – 0,2% disuelto en agua	0,1 – 0,2% disuelto en agua
Adición de cuajo	1 – 2,5 g / 100 L, según potencia del cuajo. Disuelto en agua potable	1 – 2,5 g / 100 L, según potencia del cuajo. Disuelto en agua potable
Coagulación	Temp: 32 °C Tiempo: 45 min	Temp. 32 °C Tiempo: 45 min
Corte	Con lira 1 -2 cm	Con cuchillo
Reposo	Temp: 32°C Tiempo: 5 min	Temp: 32°C Tiempo: 5 min
Agitación suave	Temp: 32°C Tiempo: 5 – 10 min	Temp: 32°C Tiempo: 5 – 10 min
Desuerado inicial	Extracción del 30% del suero	Extracción del 30% del suero
Calentamiento lento de la cuajada	Temp: 38°C Tiempo: 10 min	Temp: 38°C Tiempo: 10 min
Desuerado final	Extracción completa	Extracción completa
Salado y amasado	Cloruro de sodio 1-2,0% del peso de la cuajada	Cloruro de sodio 1-2,0% del peso de la cuajada
Moldeado	Temp: 36°C Tiempo: 25 min	Temp: 36°C N.A.
Primer volteo	30 minutos	N.A.
Segundo volteo	30 minutos	N.A.
Prensado	Tiempo: 10 min a 6 horas	Tiempo: 6 - 12 horas
Enfriamiento	Temp. 4 – 6°C	Temp. 4 – 6°C
Llevar a cuarto frío	Tiempo: 12 – 18 horas	Tiempo: 12 – 18 horas
Envase	En materiales inertes con o sin vacío	En materiales inertes con o sin vacío
Almacenamiento después de envasado	Temp. 4 – 6°C	Temp. 4 – 6°C
Temp: temperatura	Min: minutos Seg: segundos	N.A. No aplica

Con base en las etapas de elaboración del queso campesino en la Tabla 11 se indican los principales factores de contaminación y diseminación de *L. monocytogenes* durante el proceso y en el producto terminado.

**Tabla 13. Factores de contaminación y diseminación de *L. monocytogenes* en la elaboración del queso**

Factores de contaminación	Descripción / Recomendación	Etapas del proceso de elaboración
Materia prima	La leche contaminada con <i>L. monocytogenes</i> puede contaminar equipos, otra leche e instalaciones. Concentraciones mayores a 10 <sup>5</sup> UFC/g de <i>L. monocytogenes</i> en la leche cruda permitirán la sobrevivencia de la bacteria después de la pasteurización. La leche debe filtrarse inmediatamente después de la recepción para eliminar partículas que pueden vehiculizar el microorganismo (suciedad, partículas de pienso, polvo, etc.) (119, 120, 126).	Recepción
	Agua: el agua utilizada para la preparación del cloruro de calcio, si no es potable, puede contener <i>L. monocytogenes</i>	Adición de cloruro de calcio Trabajo en tina*
	<i>Listeria monocytogenes</i> puede estar presente en cuajo (Ryser, 1999), citado por Lake <i>et al</i> 2005 (118). Se recomienda el uso de materias primas certificadas.	Trabajo en tina
Instalaciones	En los depósitos de agua, pisos, drenajes y cuartos fríos se favorece la sobrevivencia y persistencia de <i>L. monocytogenes</i> y la posible formación de biopelículas. Se deben realizar reparaciones locativas para evitar la formación de depósitos de aguas e implementar un adecuado programa de limpieza y desinfección, para prevenir la formación de biopelículas en áreas de producción (120).	Todas las etapas
	Las zonas con alto contenido de humedad favorece la formación de biopelículas. Se debe evitar el uso de difusores de aire que puedan presentar acumulación de agua.	
Equipos y utensilios	El uso de materiales porosos favorece la persistencia de <i>L. monocytogenes</i> en las plantas. Los filtros y líneas de conducción son puntos de contaminación. Se deben usar equipos y utensilios de materiales apropiados como acero inoxidable que faciliten la limpieza y desinfección (75).	Todas las etapas
	La presencia de <i>L. monocytogenes</i> en el cuarto frío constituye una fuente potencial de recontaminación del producto terminado (121, 127). En equipos de refrigeración se debe tener control de la calidad microbiológica del agua refrigerante.	
Personal	Los manipuladores pueden ser una fuente de diseminación durante el proceso, por contacto directo o indirecto. Deben recibir capacitación permanente sobre buenas prácticas higiénicas (121).	Todas las etapas
	Mantener el control de la temperatura y los tiempos de proceso.	
Proceso	La refrigeración no impide la multiplicación de <i>L. monocytogenes</i> , pero mientras más baja la temperatura, más lenta será su multiplicación/ La temperatura de recepción y almacenamiento no debe ser mayor a 4°C.	Recepción y Almacenamiento
	Un proceso inapropiado de pasteurización, un equipo dañado u operado incorrectamente pueden permitir que <i>L. monocytogenes</i> u otros patógenos sobrevivan. Este es el principal punto de control durante el proceso, por tal razón es de gran importancia su monitoreo (118). Debe garantizarse la temperatura y tiempo de pasteurización. (Valor D de la leche a 72°C es de 2,7 segundos y a 63°C es de 43 segundos (128).	Pasteurización
	El suero de leche se considera una fuente de contaminación. El exceso de líquido debe ser retirado durante el proceso de prensado (129).	Pasteurización
	Períodos de tiempo prolongados posteriores a la pasteurización de la leche o del producto terminado pueden favorecer la	Enfriamiento después de la

Factores de contaminación	Descripción / Recomendación	Etapas del proceso de elaboración
	multiplicación del microorganismo El enfriamiento de la leche hasta 32°C, después de la pasteurización debe hacerse en el menor tiempo posible, al igual para el producto terminado que es llevado a refrigeración (2-4°C)	pasteurización y el prensado
Limpieza y desinfección	Los procesos de limpieza y desinfección deficientes y/o la ausencia de programas de limpieza y desinfección favorecen la formación de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> en superficies que no entran en contacto con el producto como pisos y drenajes y en superficies de contacto como equipos y utensilios. La presencia del microorganismo en medio ambiente contribuye a la contaminación del producto durante el proceso y a la recontaminación de producto terminado (10). Se debe evitar la formación de incrustaciones que favorecen la generación de biopelículas, mediante la aplicación de agentes quelantes y ablandadores. Utilizar desinfectantes eficaces y estableciendo la rotación de los mismos, esta rotación debe establecerse de acuerdo a la frecuencia y volumen de producción	Preoperacional

\*: Comprende las siguientes etapas: Adición de cuajo, coagulación, corte de la cuajada y reposo, agitación y desuerado.

### 1.8.3 Distribución, comercialización y venta de quesos

La refrigeración de los alimentos para prolongar su vida útil ha abierto una ventana ecológica para el crecimiento de *L. monocytogenes* debido a la naturaleza ubicua y psicotrófica, por lo tanto la temperatura y tiempo de almacenamiento debe ser tenido en cuenta como un factor para minimizar el crecimiento del microorganismo (130). La cantidad de *Listeria* que puede ser transferida al alimento por contacto con superficies contaminadas depende de la cantidad del microorganismo y la fuerza de adhesión a los materiales (131).

Durante la distribución, comercialización y venta se debe garantizar que las temperaturas de almacenamiento no sean mayores a 4°C, y que no exista contaminación cruzada con otros alimentos, superficies y utensilios (132).

Se debe prevenir la formación de depósitos de agua en cuartos fríos y sifones en áreas de almacenamiento, garantizando programas apropiados de limpieza y desinfección para prevenir la formación de biopelículas (133).

### 1.8.4 Consumo

Otro aspecto importante es el manejo del queso por parte los consumidores, quienes constituyen el último eslabón de la cadena bajo el concepto “*De la granja a la mesa*” y la manipulación y comportamientos de consumo son críticos para minimizar el riesgo de contraer Listeriosis (99).

Azevedo *et al* (2005), Jackson *et al* (2007) & Ovca *et al* (2009), mostraron una correlación entre la presencia de *L. monocytogenes* en la superficie de refrigeradores domésticos y

temperaturas inapropiadas en algunos de ellos, generando pérdida de la cadena de frío (134-136). Un estudio realizado en 931 refrigeradores de uso doméstico en Estados Unidos, halló que el 1,6% se encontraba por encima de 10°C, aumentando el riesgo de multiplicación de *L. monocytogenes*. Estudios en Europa han señalado que la temperatura de los refrigeradores puede variar entre 4,8-10°C, superando la temperatura apropiada de almacenamiento (137).

Adicionalmente, una revisión sobre estudios de seguridad de los alimentos realizada en los Estados Unidos, el Reino Unido y Australia (99) señala que un número substancial de consumidores realizan una manipulación inapropiada de los alimentos en el hogar, incluyendo el almacenamiento por largos períodos a altas temperaturas, contaminación cruzada y mala higiene personal, por lo tanto un aspecto importante de la gestión de inocuidad de los alimentos es la educación al consumidor, así como una información apropiada en el etiquetado del producto, indicando la temperatura de conservación y la vida útil.

## Conclusiones

- ✓ Los quesos frescos que presentan mayor prevalencia de *L. monocytogenes*, de acuerdo con los datos suministrados por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima ) para el período 2000- 2009 (4) son, en su orden, el queso campesino, el queso doble crema y la cuajada.
- ✓ No es posible estimar el riesgo de enfermar por *L. monocytogenes* asociado al consumo de queso fresco porque en Colombia no se dispone actualmente de información suficiente sobre su consumo (tamaño, número de porciones y frecuencia), así como de recuentos del microorganismo en leche cruda y en el queso, datos de dosis/respuesta ni modelos de crecimiento específicos para el queso en estudio.
- ✓ Acorde con la evidencia descrita a lo largo del documento se puede concluir que todas las etapas de la cadena presentan riesgo de contaminación por *L. monocytogenes* debido a la característica de ubicuidad del microorganismo. Sin embargo, la eficacia de los procesos de limpieza y desinfección llevados a cabo durante las etapas de producción son vitales para determinar la presencia o ausencia del microorganismo en el producto final.
- ✓ Entre las medidas preventivas y de control aplicables a lo largo de la cadena se encuentra:

### Producción Primaria

- La presencia de *L. monocytogenes* en ensilajes constituye un riesgo para la contaminación de los animales y de la leche, por tal razón se deben realizar prácticas apropiadas para la producción de ensilaje y así prevenir la introducción de esta bacteria en los hatos y su diseminación en la leche. El riesgo de contaminación se incrementa notablemente cuando los ensilajes tienen un pH mayor o igual a 4,5 (111).
- *L. monocytogenes* puede sobrevivir en ensilajes no tratados con pH mayor o igual a 4,9, por períodos de 30 a 90 días. Un aumento en el tiempo de almacenamiento del ensilaje podría reducir el recuento del microorganismo. La adición de ácido fórmico o ácido láctico disminuye el período de sobrevivencia del microorganismo en el ensilaje. Por lo anterior, la forma más práctica para reducir la presencia de este en ensilajes de pasto, es realizarlo con fermentación mayor a 30 días con microorganismos eficientes y aplicación de aditivos ácidos (138).

- Los bovinos pueden ingerir comida contaminada y posteriormente amplificar la contaminación al convertirse en portadores diseminando el microorganismo en la granja a través de las heces. Se deben realizar esfuerzos en investigación y educación encaminados a identificar y prevenir los riesgos en la producción primaria, identificando reservorios e implementando programas de reducción de patógenos (139).
- Las cepas de *L. monocytogenes* que causan mastitis en bovinos pueden ser transferidas a humanos a través de la leche cruda, un aspecto importante es la detección temprana de mastitis en bovinos y pequeños rumiantes. Por tal razón el recuento de células somáticas y la implementación rutinaria de la prueba CMT (*California Mastitis Test*) son recomendables para detectar procesos inflamatorios en la glándula mamaria y deben ser de carácter obligatorio en las fincas (113). Para prevenir la presencia de *L. monocytogenes* en leche cruda resulta fundamental la aplicación de buenas prácticas ganaderas (aseguramiento integrado de fincas), principalmente la implementación de programas de manejo de residuos sólidos y líquidos, tratamiento de aguas, programas de control de mastitis y uso de condiciones higiénicas durante el ordeño, siendo programas esenciales para prevenir la acumulación, la sobrevivencia y la transmisión de patógenos (121).
- El monitoreo de los animales, las condiciones de manejo, y los registros de la finca pueden contribuir a la identificación y manejo del riesgo. El Sistema de Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (HACCP) puede ser utilizado adicionalmente como una estrategia para el control del producto (140).
- La leche sin pasteurizar usualmente es consumida por los manipuladores en sus hogares, sus familias y vecinos en las granjas, aumentando el riesgo de infección y diseminación de *L. monocytogenes* en áreas rurales (139). Una medida de control será educar a la población sobre el riesgo que representa el consumo de leche cruda y quesos elaborados a partir de ésta. Como medida de control para *L. monocytogenes* se debe promover la elaboración de quesos frescos a partir de leches higienizadas (139).

### **Ordeño**

- La presencia de animales portadores asintomáticos en la producción primaria se ha asociado con el riesgo de contaminación de la leche y la higiene durante la rutina de ordeño (120, 141). En la granja, para disminuir la contaminación de la leche en los tanques de almacenamiento, se requiere la adopción de prácticas de ordeño y de higiene apropiadas. Los

procesos de limpieza y desinfección de la ubre antes del ordeño reducen la contaminación microbiana de equipos y las infecciones de la glándula mamaria debido a la disminución de la carga ambiental de *L. monocytogenes* en los cuartos de las vacas (116, 142). Un aspecto fundamental es la utilización de “agua limpia” para los procesos de limpieza de la ubre y los equipos y del lavado de las manos de los operarios (118, 143).

- La presencia de *L. monocytogenes* en leche cruda representa un riesgo para la contaminación de las plantas, aumentando la carga y favoreciendo la contaminación post-proceso, por tal razón se requiere reducir la contaminación de la leche que es transportada a las plantas. Un aspecto fundamental es prevenir la formación de biopelículas en los equipos de ordeño mediante implementación de protocolos de limpieza y desinfección basados en las recomendaciones del fabricante.

### **Almacenamiento En Cantina o Tanque**

- En esta etapa se debe garantizar la implementación de protocolos de limpieza y desinfección apropiados para los tanques de enfriamiento o cantinas con el objeto de prevenir la formación de biopelículas (119, 120). Debido a que el número de microorganismos puede incrementarse cuando la leche es almacenada en refrigeración, se debe controlar la temperatura de los tanques de enfriamiento (4°C), y el tiempo de almacenamiento después del ordeño (118).
- El almacenamiento del estiércol en zonas alejadas al área de ordeño disminuye el riesgo de contaminación (por reducción del riesgo de contaminación de los animales) (122).

### **Acopio/Transporte**

- En esta etapa el riesgo de contaminación por *L. monocytogenes* es similar al descrito en la etapa anterior. Debe considerarse el control del mantenimiento de la temperatura de refrigeración y el tiempo de almacenamiento, así como la implementación de programas de limpieza y desinfección apropiados. Si bien la refrigeración no inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes*, sí lo hace más lento, por tal razón es fundamental el mantenimiento de la cadena de frío desde la finca hasta la planta procesadora.

### **Proceso de Elaboración del Queso Campesino**

- La presencia de leche cruda contaminada con *L. monocytogenes* en las plantas de procesamiento de queso constituye un riesgo, no sólo por el uso de leches no pasteurizadas para la producción de quesos, sino también por la contaminación cruzada con quesos procesados (121). La mayoría de quesos artesanales producidos en establecimientos de pequeña escala son elaborados a partir de leche proveniente de granjas con diferentes condiciones de manejo, por lo cual se recomienda a éstos la implementación de sistemas de aseguramiento de la calidad (materias primas a producto terminado) (117).
- El control de *L. monocytogenes* en las plantas de derivados lácteos comprende una serie de medidas que deben manejarse de manera integrada para reducir la presencia de este patógeno en quesos. Los aspectos que han reducido la presencia de *L. monocytogenes* en Estados Unidos, comprenden: el monitoreo de la leche cruda, la aplicación de programas eficientes de limpieza y desinfección, estandarizados y documentados; y la implementación de sistemas como HACCP (144). Estas medidas deberán aplicarse en todas las plantas productoras de quesos, independientemente del tamaño (145).
- Las medidas de control integradas involucran aquellos aspectos esenciales para la implementación de Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), enfatizando en el diseño y distribución de la planta, para prevenir la contaminación cruzada; el manejo de temperatura ambiental y de almacenamiento; programas de limpieza y desinfección; higiene del personal; condiciones de almacenamiento y distribución; trazabilidad y retiro de producto contaminado (144, 145).
- A continuación se mencionan las medidas de prevención más importantes:

**Control de materia prima:** Se debe utilizar materia prima (leche) que no tenga concentraciones mayores a  $10^5$  UFC/g de *L. monocytogenes* que puede favorecer la sobrevivencia de la bacteria después de la pasteurización (119, 120, 126). Se debe garantizar que el agua o el cuajo no estén contaminados con el microorganismo.

**Instalaciones y equipos:** Las instalaciones deben ser construidas de manera que se faciliten las operaciones de limpieza y desinfección. Se debe evitar la formación de depósitos de agua, en pisos, drenajes y cuartos fríos, para prevenir la colonización y formación de biopelículas de *L. monocytogenes* (120).

El uso de equipos sanitariamente diseñados con bordes curvos, sin grietas ni espacios muertos que faciliten una adecuada limpieza y desinfección (121). Se recomienda que éstos sean de acero inoxidable ya que soportan mejor el deterioro por la acción prolongada de agentes químicos.

**Pasteurización:** En esta etapa se deberán respetar los tiempos y temperaturas recomendados, 72°C por 15 segundos o 63°C por 30 minutos (75). Se debe garantizar la integridad, buen funcionamiento y operación adecuada del pasteurizador, ya que esta etapa es un punto crítico para el control del microorganismo.

**Procesos de limpieza y desinfección:** Los procesos de limpieza y desinfección diseñados para el control de *L. monocytogenes*, especialmente en superficies de contacto, deben prevenir la formación de biopelículas, en caso de que éstas se produzcan. Para su destrucción se requiere la aplicación de temperaturas superiores a 76°C durante 6 minutos (146). Es importante señalar que las cepas de *L. monocytogenes* pueden formar biopelículas en períodos de 48 horas a 20°C.

Se sugiere como métodos de limpieza y desinfección la combinación de tratamientos como limpieza mecánica y uso de detergentes que no generen aerosoles, tales como rociadores de alta presión combinados con espuma, y desinfectantes que resulten eficaces para la remoción de biopelículas (121).

En la tabla 14 se muestran las condiciones de uso de algunos agentes utilizados para la inactivación de *L. monocytogenes* en la industria quesera, según un estudio publicado por Lourenço (140)

**Tabla 14. Reporte de condiciones de uso de algunos agentes utilizados en la industria quesera para la inactivación de *L. monocytogenes***

Agentes	Concentración	Tiempo de exposición	Temperatura (°C)
Alquil-amina-acetato	2-3%	10-20 min	Ambiente Lavar previamente con agua a 40-60°C.
Desinfectantes clorados	2-5%	15 min	70-80°C para superficies con grasa
	0,5-2,0%	15 min	40-50°C superficies con bajo contenido de grasa
Acido fosfórico	0,5%	10-15 min	50-70°C
Tensoactivos aniónicos	0,5-1,0%	—	Ambiente

Fuente: Lourenço,2009 (147).

Se debe realizar la rotación de los desinfectantes teniendo en cuenta el principio activo.

**Uso de antimicrobianos:** *L. monocytogenes* se ve inhibida por el uso de compuestos que incluyen ácidos orgánicos, ácidos grasos, antioxidantes, ahumado y especias (10). Sin embargo, por las características sensoriales del queso fresco colombiano, el uso de especias y proceso de ahumado no pueden aplicarse. Investigaciones en leche cruda realizadas en Estados Unidos en 2008 han demostrado que la aplicación de nisina en concentraciones de 62,5, 125, 250 y 500 UI/ml son suficientes para inactivar a *L. monocytogenes* (148).

En estudios recientes se ha observado que microorganismos autóctonos de los quesos pueden inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*, siendo los principales géneros *Enterococcus* spp, *Lactococcus* spp, *Chyseeobacterium* spp los que han mostrado en cultivo mixto inhibir a este patógeno, debido a la producción de sustancias anti-listericidas (149). No obstante estos hallazgos todavía no pueden ser aplicados a escala industrial.

**Tecnologías emergentes:** El uso combinado de altas presiones hidrostáticas y temperaturas suaves sobre leches crudas, puede ser eficaz para inhibir a *L. monocytogenes*. Chen & Hoover redujeron 8 UI aplicando una dosis de 500 MPa a 50°C. También se han utilizado dosis de 500 MPa durante 10 minutos a 20°C, en leches empleadas para la elaboración de queso Camembert, siendo este tratamiento suficiente para inhibir concentraciones de *L. monocytogenes* de 2-4 UI/ml (146). Otra tecnología recientemente evaluada es la microfiltración aplicada a la leche, la cual es utilizada para la elaboración de queso (148).

**Monitoreo ambiental:** se ha sugerido como una prueba útil para verificar la efectividad de las medidas preventivas de higiene. Este monitoreo debe incluir muestras ambientales (paredes, pisos, drenajes y condensados de los cuartos fríos), equipo de procesamiento y leche sin pasteurizar y pasteurizada (10).

**Almacenamiento:** En el almacenamiento del queso fresco colombiano las temperaturas deben ser inferiores a 4°C para reducir la multiplicación de *L. monocytogenes*. Se deberá evitar la condensación de agua en los cuartos fríos. Otro aspecto fundamental es el tiempo de almacenamiento debido a la naturaleza psicrófila del microorganismo (130).

## **DISTRIBUCION COMERCIALIZACION Y VENTA**

Se debe garantizar que las temperaturas de almacenamiento sean menores a 4°C y que el almacenamiento no sea por periodos de tiempo prolongados que puedan permitir la proliferación del microorganismo; además que no exista contaminación cruzada con otros alimentos, superficies y utensilios. Se debe prevenir la formación de depósitos de agua en cuartos fríos y sifones en áreas de almacenamiento, implementando programas de limpieza y desinfección eficaces para prevenir la formación de biopelículas (133).

## **CONSUMIDOR**

Un aspecto importante para disminuir el riesgo de infección por *L. monocytogenes* es la educación al consumidor, orientada especialmente a los grupos de riesgo (141), sobre aspectos relacionados con la manipulación de los alimentos en el hogar, el almacenamiento, la contaminación cruzada y las prácticas de higiene personal. Se deberá informar al consumidor sobre la temperatura de refrigeración apropiada y la limpieza de refrigeradores domésticos, así como de la relevancia de conocer la vida útil y la temperatura de conservación que aparecen en las etiquetas de los productos.

## Recomendaciones

### a. Cadena productiva (queso campesino)

- i. Aplicar medidas higiénicas adecuadas en todas las etapas de la cadena.
- ii. Evitar la formación de biopelículas en equipos de ordeño, tanques de almacenamiento, carrotanques, pasteurizador y demás equipos y utensilios del proceso, así como en los equipos de frío, utilizando materiales adecuados y programas de monitoreo del microorganismo, haciendo especial énfasis en los programas de limpieza y desinfección y los de mantenimiento de valvulas.
- iii. Verificar que los ensilados utilizados en la alimentación animal tengan valores de pH inferiores a 4,5, para reducir la contaminación de los animales con *L. monocytogenes* y por ende de la leche.
- iv. Garantizar la temperatura de los tanques de almacenamiento de leche por debajo de  $4\pm 2^{\circ}\text{C}$  mediante la implementación de programas de mantenimiento y calibración de los equipos en las granjas, centros de acopio y plantas de procesamiento.
- v. Implementar y controlar las prácticas higiénicas apropiadas antes y durante la rutina de ordeño.
- vi. Retirar y depositar el estiércol en zonas alejadas al ordeño para su posterior disposición.
- vii. Monitorear la presencia de mastitis mediante el recuento de células somáticas y la prueba CMT.
- viii. La leche destinada para la elaboración de quesos frescos debe ser pasteurizada, con el objeto de eliminar *L. monocytogenes*.
- ix. El almacenamiento de los quesos en planta y durante la distribución y comercialización y venta debe realizarse a temperatura de refrigeración, por debajo de  $4^{\circ}\text{C}$ , y con una humedad relativa menor al 85%.
- x. Se debe contar con un sistema de gestión de inocuidad (HACCP o similar) implementado en cada uno de los eslabones de la cadena, para garantizar la obtención de queso fresco que no represente riesgo para los consumidores, tanto en los procesos industriales como artesanales.

- xi. Se debe realizar monitoreo rutinario de *L. monocytogenes* en granja, leche cruda, planta y producto terminado.

**b. Capacitación**

- i. Los operarios y demás actores de la cadena productiva deben recibir capacitación permanente sobre los peligros asociados a *L. monocytogenes* y sus medidas de prevención y control.
- ii. Informar convenientemente al consumidor, especialmente a los grupos vulnerables sobre el riesgo asociado al consumo de queso fresco debido a la posible contaminación con *L. monocytogenes*.
- iii. Se debe garantizar que todo el personal de salud y de las entidades del estado con funciones de vigilancia se capacite en diagnóstico clínico de Listeriosis y técnicas de laboratorio para la identificación, serotipificación y cuantificación de *L. monocytogenes*.

**c. Entidades responsables de la vigilancia de enfermedades y el control de los alimentos:**

- i. Establecer estrategias que permitan realizar estudios completos de los casos y brotes de Listeriosis estableciendo la relación entre el alimento implicado y los individuos afectados.
- ii. Mejorar la capacidad científica, técnica y operativa de la red de laboratorios para identificar, serotipificar y reportar todas las cepas de *L. monocytogenes* aisladas en animales, humanos y alimentos.
- iii. Se recomienda que el país adopte una metodología de cuantificación de *L. monocytogenes* para suministrar información útil para la evaluación de riesgos, y de esta manera fortalecer las políticas de inocuidad, dado su impacto en la salud pública y el comercio.
- iv. Se debe actualizar la normatividad para quesos donde debe incluirse la búsqueda de *L. monocytogenes* como obligatoria.
- v. Establecer la notificación obligatoria de Listeriosis en humanos, teniendo en cuenta sus diferentes manifestaciones (septicemia, meningitis y abortos).
- vi. Debe disponerse de patrones de consumo detallados en el país, que incluyan el tipo de queso que se consume, la cantidad, el origen (industrializado o artesanal),

asociados a grupos de riesgo y población general, por lo que debe realizarse un estudio que pueda generar esta información.

- vii. Es necesario definir los criterios unificados para la denominación y clasificación de los diferentes tipos de queso fresco existentes en el país, con el objeto de armonizar el sistema de información para la recolección de datos de IVC.
- viii. Para el estudio de brotes es importante realizar el aislamiento del microorganismo a partir de muestras clínicas y en el alimento sospechoso mediante los métodos descritos anteriormente, y posteriormente deberán usarse técnicas moleculares para establecer la posible asociación entre las cepas de origen clínico y las aisladas a partir del alimento.

#### **d. Otros**

- i. Con base en los estudios de ocurrencia internacional, y la poca información del país, se recomienda realizar estudios de prevalencia que deberán contar con un diseño robusto, métodos de análisis validados y sistemas de muestreo que permita identificar, cuantificar y serotipificar *L. monocytogenes* en queso fresco en puntos de procesamiento, comercialización y distribución en los departamentos de mayor producción quesera del País y que posean pisos térmicos diversos.
- ii. Se debe contar con datos de consumo de los diferentes tipos de quesos que incluyan la estimación de cuántas personas la consumen, en qué cantidad y cuáles son las poblaciones con mayor frecuencia de consumo en Colombia.
- iii. Caracterizar la industria quesera del país (formal e informal) incluyendo la producción, comercialización y distribución tanto del mercado interno como externo.
- iv. Para generar adecuados documentos científicos se requiere contar con datos de ocurrencia de *L. monocytogenes* y, para evitar la duplicación de esfuerzos y recursos se solicitará a la industria, a la academia, organismos estatales y otras entidades privadas información existente sobre el tema. Para ello, la UERIA redactará procedimientos e instrumentos para unificar la recolección de la información.

Las vías para recopilar información que se proponen, asegurando la confidencialidad cuando sea requerida, son:

- Industria: Gremios, cámaras, asociaciones
- Academia: universidades, centros de investigación

- Colciencias, Comité Nacional del Codex Alimentarius de Colombia.
- v. Para la realización de los estudios propuestos, se deben proveer recursos y entre los mecanismos a considerar se debería incluir priorizaciones de investigación tanto por parte de la academia como por los otros actores del Sistema MSF.

## Glosario

**Agua Limpia:** Agua que no pone en peligro la inocuidad de los alimentos en las circunstancias en que se utiliza.

**Años de Vida Potencialmente Perdidos (AVPP):** Indicador de estado de salud que establece los años de vida potencialmente perdidos por grupos de enfermos, por 100 mil personas

**Biopelícula:** Una biopelícula o biofilm es un ecosistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas.

**Cadena Agro-Productiva** se define como el conjunto de actores y de actividades que abarcan la provisión de insumos y otros servicios, producción primaria, transformación agroindustrial, comercialización interna, comercio exterior y consumo.

**Ensilaje:** Técnica de conservación de forrajes verdes, tubérculos, raíces y algunos residuos industriales, que consiste en la fermentación de dichos productos con el fin de ser destinados para la alimentación de ganado.

**Hatos Abiertos:** Son aquellos hatos donde las novillas de reemplazo provienen de otras explotaciones

**Pasteurización:** Tratamiento térmico el cual, mediante una relación de temperatura y tiempo, busca disminuir o destruir los microorganismos presentes, sin alterar de manera esencial su valor nutritivo y características fisicoquímicas y organolépticas. Las condiciones mínimas de pasteurización son aquellas que tienen efectos bactericidas equivalentes al calentamiento de cada partícula a 72°C - 76°C por 15 segundos (pasteurización de flujo continuo) o 61°C a 63°C por 30 minutos (pasteurización discontinua) seguido de enfriamiento inmediato hasta temperatura de refrigeración.

**Queso:** Es el producto obtenido por coagulación de leche, de la crema de leche, de la crema de suero, del suero de la mantequilla o de la mezcla de algunos o todos estos productos, por la acción del cuajo u otros coagulantes aprobados.

**Queso Artesanal:** Es el producto elaborado basado en un proceso de producción que involucra equipos y utensilios poco complejos como tanques, tinajas y prensas. Se caracteriza por contar con la participación de personal polivalente durante su elaboración y por tener alta variabilidad. Además, generalmente es elaborado a partir de leche de un área específica y por participar en un mercado localizado con distribución directa.

**Queso Fresco:** Es el producto higienizado sin madurar, que después de su fabricación está listo para el consumo. En el mercado Colombiano se ofrecen diferentes variedades de queso fresco con las siguientes denominaciones: queso campesino, cuajada, queso doble crema, queso paipa, queso antioqueño, queso tipo mozzarella, entre otros. Según la legislación colombiana pueden ser clasificados de acuerdo al contenido de humedad: blando, semiblando, semiduro y duro; y según contenido de grasa en: rico en grasa, graso, semigraso, semimagro y magro.

**Queso Industrial:** Es aquél elaborado en un proceso de producción que involucra personal especializado y organizado; y equipos y utensilios simples y complejos, normalmente soportados en procesos de automatización. Generalmente se utiliza leche de diferentes procedencias geográficas y la producción es a alta escala. Este producto tiene poca variabilidad y puede participar en diferentes canales de comercialización debido a los volúmenes de producción. El precio esta condicionado por el mercado.

**Termización:** Tratamiento térmico al que se somete la leche cruda, con el objeto de reducir el número de microorganismos presentes en la misma y permitir un almacenamiento más prolongado antes de someterla a elaboración ulterior. Las condiciones de la termización son de mínimo 62°C durante 15 a 20 segundos, seguido de enfriamiento inmediato hasta temperatura de refrigeración. La leche termizada debe reaccionar positivamente a la prueba de fosfatasa alcalina, siendo prohibida su comercialización para consumo humano directo. La termización no reemplaza la pasteurización.

## **SIGLAS**

AOAC: Association of Analytical Chemists

BAM: Bacteriological Analytical Manual

CDC: Centro de Control de Enfermedades

Conpes: Consejo Nacional de Política Económica y Social

DTS: Dirección Territorial de Salud

Ensin: Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia

FDA: Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos)

FSAI: Food Safety Authority of Ireland (Autoridad Irlandesa de Seguridad Alimentaria)

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

INS: Instituto Nacional de Salud

Invima : Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos

ISO: International Organization for Standardization (Organización Internacional para la Estandarización)

LCR: Líquido Cefaloraquídeo

MSF: Medidas Sanitarias y Fitosanitarias

MPS: Ministerio de la Protección Social

OMS: Organización Mundial de la Salud

Sivigila: Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública

UE: Unión Europea

UFC: Unidad Formadora de Colonia

USDA: United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos)

## AGRADECIMIENTOS

La Unidad de Evaluación de Riesgo para la Inocuidad de los Alimentos (UERIA) del Instituto Nacional de Salud y el Ministerio de la Protección Social agradecen a todos aquellos que con su tiempo y experiencia han contribuido en la elaboración del documento denominado **Evaluación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en queso fresco**, a través de la búsqueda de información científica, su análisis y observaciones.

Manifiesta su agradecimiento al Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima) por los aportes y la información suministrada para el desarrollo de la presente evaluación de riesgos.

Asimismo, la contribución de las Subdirecciones de Investigación, Vigilancia y Control en Salud Pública y Red Nacional de Laboratorios del Instituto Nacional de Salud, principalmente al Grupo de Vigilancia de Factores de Riesgo Ambiental, por su orientación en el análisis de la información del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (Sivigila).

La UERIA reconoce que la colaboración y aportes de la Comisión intersectorial de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias a través de la Secretaría Técnica a cargo del Departamento Nacional de Planeación contribuyeron satisfactoriamente a este proceso mediante su apoyo en la búsqueda de información y como facilitador con los actores del Sistema de Medidas Sanitarias y Fitosanitarias.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bell C, Kyriakides M. *Listeria*. Una aproximación práctica al microorganismo su control en los alimentos, 2000. Editorial Acribia, Primera edición. Pg 173.
2. Vazquez-Boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, Gonzalez-Zorn B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(3):584.
3. FAO-OMS. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el Consumo. 2004. Disponible en URL [ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4\\_es.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4_es.pdf)
4. Colombia, Invima (Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos) Laboratorios de la Red Nacional de Salud Pública. Reporte sobre serotipos de *L. monocytogenes* aislados en alimentos. 2010
5. Rocourt J, Hogue A, Toyofuku H, Jacquet C, Schlundt J. *Listeria* and listeriosis: Risk assessment as a new tool to unravel a multifaceted problem. *AJIC*. 2001;29(4):225-7.
6. Murray E, Webb R, Swann M. A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. spp.). *J Pathol Bacteriol*. 1926;29(4):407-39.
7. McLauchlin J. The relationship between *Listeria* and listeriosis. *Food Control*. 1996;10(1);7(4-5):187-93.
8. Mataragas M, Zwietering MH, Skandamis PN, Drosinos EH. Quantitative microbiological risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers -- Specific application to *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat meat products. *Int J Food Microbiol*. 2010;141(Supplement 1):170-9.
9. Bemrah N, Sanaa M, Cassin MH, Griffiths MW, Cerf O. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of soft cheese made from raw milk. *Prev Vet Med*. [doi: DOI: 10.1016/S0167-5877(98)00112-3]. 1998;37(1-4):129-45.
10. Todd E, Notermans S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 2010.
11. Linnan M, Mascola L, Lou X, Goulet V, May S, Salminen C, Hird D, Yonekura M, Hayes P, Weaver R. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *N Eng J Med*. 1988;319(13):823-8.
12. Goulet V, Hedberg C, Le Monnier A, De Valk H. Increasing incidence of listeriosis in France and other European countries. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(5):734.
13. MS. Ministerio de Salud de Colombia, Resolución 2310 de 1986 "Por la cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979, en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos".
14. MS. Ministerio de Salud de Colombia, Resolución 01804 de 1989, Por la cual se modifica la Resolución No 02310 de 1986, (24 de Febrero) que reglamenta parcialmente el título V de la Ley 09 de El Ministerio de Salud.
15. Rocourt J, BenEmbarek P, Toyofuku H, Schlundt J. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2003;35(3):263-7.
16. De Buyser M, Dufour B, Maire M, Lafarge V. Implication of milk and milk products in foodborne diseases in France and in different industrialised countries. *Int J Food Microbiol*. 2001;67:1-17.
17. MacDonald P, Whitwam R, Boggs J, MacCormack J, Anderson K, Reardon J, Saah J, Graves L, Hunter S, Sobel J. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. *Clin Infect Dis*. 2005;40(5):677.
18. Carrique-Mas J, Hökeberg I, Andersson Y, Arneborn M, Tham W, Danielsson-Tham M, Osterman B, Leffler M, Steen M, Eriksson E. Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese—an outbreak of listeriosis? *Epidemiol Infect*. 2003;130(01):79-86.
19. Makino SI, Kawamoto K, Takeshi K, Okada Y, Yamasaki M, Yamamoto S, Igimi S. An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *Int J Food Microbiol*. 2005;104(2):189-96.
20. Gaulin C, Ramsay D, Ringuette L, Ismaïl J. First documented outbreak of *Listeria monocytogenes* in Quebec, 2002. *Canada communicable disease report= Relevé des maladies transmissibles au Canada*. 2003;29(21):181.
21. Bille J, Catimel B, Bannerman E, Jacquet C, Yersin M, Caniaux I, Monget D, Rocourt J. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2006;58(6):1857.
22. EFSA. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006 *The EFSA Journal*. 2007;130:3-352.
23. EFSA. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne

- Outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal*. 2006;94:1-288.
24. Koch J, Dworak R, Prager R, Becker B, Brockmann S, Wicke A, Wichmann-Schauer H, Hof H, Werber D, Stark K. Large Listeriosis Outbreak Linked to Cheese Made from Pasteurized Milk, Germany, 2006–2007. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;560-2.
  25. Noriega L, Ibáñez S, González P, Yamamoto M, Vial P. *Listeria monocytogenes*: Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect*. 2008;25(5):342-9.
  26. Fretz R, Sagel U, Ruppitsch W, Pietzka A, Stöger A, Huhulescu S, Heuberger S, Pichler J, Much P, Pfaff G. Listeriosis outbreak caused by acid curd cheese Quargel, Austria and Germany 2009. *Euro Surveill*. 2010;15(5).
  27. Todd E. The International Risk Governance Council Framework and Its Application to *Listeria monocytogenes* in Soft Cheese Made from Unpasteurised Milk. *Food Control*. 2010:1-12.
  28. CDC. Outbreak of Listeriosis Associated with Homemade Mexican-Style Cheese — North Carolina, October 2000–January 2001. *Mortality and morbidity weekly report - MMWR*. 2001 50(26):560-2.
  29. CDC. Outbreak of *Listeria monocytogenes* Infections Associated With Pasteurized Milk From a Local Dairy—Massachusetts, 2007 MMWR. *MMWR*. 2008;57:1097-100.
  30. SIVIGILA. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, Colombia. *Inf Quinc Epidemiol Nac (IQUEN)*. 2009;14(20):305-20.
  31. da Silva M, Hofer E, Tibana A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese Produced in Rio de Janeiro, Brazil. *J Food Prot*. 1998;61(3):354-6.
  32. Chaves C, Arias M. Caracterización de cepas de *Listeria monocytogenes* realizados a partir de queso fresco proveniente de diferentes zonas productoras costarricenses. *Arch Latinoam Nutr*. 2009;51(1):66-70.
  33. Iñiguez-palomares P, Díaz M, Acedo F, González H. Detección y prevalencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco por reacción en cadena de la polimerasa y método oficial. Laboratorio de Microbiología de la Coordinación de Ciencias de los Alimentos, Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, México. Trabajo de Grado. 83 pp. 2000.
  34. Ellner R, Marth E. Aislamiento de *Listeria* spp. de diversos alimentos en Costa Rica. *Rev Cost Cienc Med*. 1991;12:82-6.
  35. Montañez C, Lozano M, Espinosa F, Morales R. Detección de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México. *Vet Méx*. 2006;37:4.
  36. Villalobos L, Martínez R. Aislamiento e identificación por métodos convencionales y PCR de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos frescos comercializados en Cumana, Venezuela. *Revista Científica*. 2010;17(5).
  37. Schöbitz R, Marín M, Horzella M, Carrasco E. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro sur*. 2001;29(2):114-9.
  38. Espinosa A, De La Torre M, Salinas F, Sanchez V. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de ICA, enero-marzo 2003. *Rev peru med exp salud publica*. 2004;21:2.
  39. Vitas AI, Garcia-Jalon VAel. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *Int J Food Microbiol*. 2004;90(3):349-56.
  40. Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Hogg T, Gibbs P. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. *Food Microbiol*. 2004;21(2):213-6.
  41. Marzocca M, Marucci P, Sica M, Alvarez E. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). *Rev Argent Microbiol*. 2004;36(4).
  42. Zagovalov T, Castillo V, Chang A, de los Reyes M, Suárez F. Determinación de *Listeria* spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Rev Cubana Salud Pública*. 2005;31(3):217-22.
  43. Abrahão W, da Silva Abrahão P, Monteiro C, Pontarolo R. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese and ice cream produced in the State of Paraná, Brazil. *Bras J Pharm Sci*. 2008;44(2).
  44. Márquez J, García C. Microflora patógena del queso blanco "telita" elaborado en cuatro estados de Venezuela. *An Venez Nutr*. 2007;20:17-21.
  45. Brant L, Fonseca L, Silva M. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. *Arq Bras Med*. 2007;59(6).
  46. Zaffari C, Mello J, Costa M. Bacteriological quality of homemade cheeses commercialised in roads of the northern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*. 2007;37:862-7.
  47. Saltijeral J, Alvarez V, Garcia B. Presence of *Listeria* in Mexican cheeses. *J Food Saf*. 1999;19(4):241-7.
  48. Díaz G, Muñoz A. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leches crudas y pasteurizadas en el antiplano cundiboyacense. *Biomedica*. 1998;14(1):58.
  49. Carrascal A, Albarracín Y, Sarmiento P. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de

- vaca expandida en el municipio de Pamplona, Colombia. *Bistua*. 2007;5(2):49-57.
50. Vanegas MC, Vásquez E, Martínez AJ, Rueda AM. Detection of *Listeria monocytogenes* in raw whole milk for human consumption in Colombia by real-time PCR. *Food Control*. 2009;20(4):430-2.
51. Mosos R, Ochoa M, Estrada S. Importancia de los aislamientos de *Listeria monocytogenes* en quesos y quesitos elaborados en algunos municipios del departamento de Antioquia. *Bol Epidemiol Antioquia*. 1997.
52. Baquero D, Acuña M, Bernal A, Campuzano S. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de Câqueza, Cundinamarca. *Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca*. 2006.
53. Albarracín Y, Sarmiento P, Carrascal A, Mercado M. Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua*. 2006;4(2):30.
54. Gallegos J, Arrieta G, Poutou R, Trespalacios A, Carrascal A. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeros; Frequency of *Listeria* spp. in coastal Colombian cheeses. *Rev MVZ Cordoba*. 2007;12(2):996.
55. MPS. Ministerio de la Protección Social de Colombia. Sistema de Inspección, Vigilancia y Control de las Direcciones Territoriales de Salud (IVC) . 2010.
56. FDA. Bacteriological Analytical Manual (BAM) : Chapter 10: Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods . Disponible en: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071400>.
57. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (OMA). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. 18th Edit. 1995.
58. Nufer U, Stephan R, Tasara T. Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7 °C. *Food Microbiol*. 2007;24(5):444-51.
59. Ministerio de Salud de Colombia. Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano. Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (Invima) . División de Alimentos y Bebidas Alcohólicas. Sección de Microbiología de Alimentos. Colombia.1998.111-18 p.
60. Scotter S, Langton S, Lombard B, Lahellec C, Schulten S, Nagelkerke N. Validation of ISO method 11290: Part 2. Enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int J Food Microbiol*. 2001;70(1-2):121-9.
61. Codina M, de Cueto M, Echevarría J, Vicente D. Diagnóstico microbiológico de las infecciones del sistema nervioso central. Procedimientos en microbiología clínica recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ministerio de sanidad de España. 2010.
62. Cercenado E, Torroba L, Canton R, Martínez-Martínez L, Chaves F, García-Rodríguez J, López-García C, Aguilar L, García-Rey C, García-Escribano N. Multicenter Study Evaluating the Role of Enterococci in Secondary Bacterial Peritonitis. *J Clin Microbiol*. 2010;48(2):456.
63. Jorgensen J, Hindler J, Citron D, Cockerill F, Fritsche T, Funke G, Patel J, Schreckenberger P, Turnidge J, Walker R, Welch D. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. *Clin Lab Stand Inst*. 2008;26(19):1-76.
64. Graves L, Helsel L, Steigerwalt A, Morey R, Daneshvar M, Roof S, Orsi R, Fortes E, Milillo S, den Bakker H. *Listeria marthii* spp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(6):1280.
65. Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont P, Le Fleche-Mateos A, Roche S, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Monnier A, Lecuit M. *Listeria rocourtiaie* spp. nov. *Int JSyst Evol Microbiol*. 2010;60(9):2210.
66. Orsi RH, Bakker HCd, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*. 2010;In Press, Corrected Proof.
67. McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *Int J Food Microbiol*. 2004;92(1):15-33.
68. Schönberg A, Bannerman E, Courtieu AL, Kiss R, McLauchlin J, Shah S, Wilhelms D. Serotyping of 80 strains from the WHO multicentre international typing study of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol*. 1996;32(3):279-87.
69. Brosch R, Chen J, Luchansky J. Pulsed-field fingerprinting of listeriae: identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60(7):2584.
70. Schuchat A, Robinson K, Wenger J, Harrison L, Farley M, Reingold A, Lefkowitz L, Perkins B. Bacterial Meningitis in the United States in 1995. *N Eng J Med*. 1997;337(14):970.
71. Nørnung B, Andersen J. Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol*. 2000;30(3):228-32.

72. McLauchlin J. Human listeriosis in Britain, 1967–85, a summary of 722 cases: 2. Listeriosis in non-pregnant individuals, a changing pattern of infection and seasonal incidence. *Epidemiol Infect.* 1990;104(02):191-201.
73. Farber J, Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1991;55(3):476.
74. Koutsoumanis K, Kendall P, Sofos J. A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and aw when grown in suspension or on a solid surface. *Food Microbiol.* 2004;21(4):415-22.
75. FSAI. (Food Safety Authority of Ireland), The Control and Management of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food. Abbey Court Lower Abbey Street Dublin 2005 pp 94. 2005.
76. ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods ICMSF. Microorganismos de los Alimentos: Características de los Patógenos Microbianos. Ed. Acribia España. 1998
77. Lindqvist R, Westöö A. Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. *Int J Food Microbiol.* 2000;58(3):181-96.
78. Buchanan R, Damert W, Whiting R, van Schothorst M. Use of epidemiologic and food survey data to estimate a purposefully conservative dose-response relationship for *Listeria monocytogenes* levels and incidence of listeriosis. *J Food Prot.* 1997;60(8):918-22.
79. Slutsker L, Schuchat A. Listeriosis in humans. *Listeria Listeriosis Food Saf.* 1999:75–95.
80. Kattan A, Saidu K. *Listeria* Neonatal infection. *Ann Saudi Med.* 1997;17(6):636-7.
81. Garrido V, Vitas A, García-Jalón I. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain. *Food Control.* 2009;20(11):986-91.
82. Torres K, Sierra S, Poutou R, Vera H, Carrascal A, Mercado M. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. *UDCA Actualidad & Divulgación Científica.* 2004;7(1):25-57.
83. Jensen A, Ethelberg S, Smith B, Nielsen E, Larsson J, Mølbak K, Christensen J, Kemp M. Substantial increase in listeriosis, Denmark 2009. *Euro Surveill.* 2010;15(12):19522. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=>.
84. FDA/USDA/CDC. Quantitative assessment of relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready to eat foods 2003. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Food/ScienceResearch/ResearchAreas/RiskAssessmentSafetyAssessment/UCM197330.pdf>. Consulta Abril 2011.
85. Wiedmann M. ADISA Foundation Scholar Award--An Integrated Science-Based Approach to Dairy Food Safety: *Listeria monocytogenes* as a Model System. *J Dairy Sci.* 2003;86(6):1865-75.
86. Farber J, Ross W, Harwig J. Health risk assessment of *Listeria monocytogenes* in Canada. *Int J Food Microbiol.* 1996;30(1-2):145-56.
87. Gombas D, Chen Y, Clavero R, Scott V. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *J Food Prot.* 2003;66(4):559-69.
88. Doyle M, Mazzotta A, Wang T, Wiseman D, Scott V. Heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot.* 2001;64(3):410-29.
89. Haas CN, Thayyar- Madabusi A, Rose JB, Gerba CP. Development and Validation of Dose-Response Relationship for *Listeria monocytogenes*. *Quant Microbiol.* 1999;1(1):89-102.
90. Audurier A, Pardon P, Marly J, Lantier F. Experimental infection of mice with *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Annales de microbiologie.* 1980;131(1):47.
91. Donnelly CW. Concerns of Microbial Pathogens in Association with Dairy Foods. *J Dairy Sci.* [doi: DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78838-8]. 1990;73(6):1656-61.
92. Notermans S, Dufrenne J, Teunis P, Chackraborty T. Studies on the risk assessment of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Prot.* 1998;61(2):244-8.
93. Notermans S, Hoornstra E. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in fish products: some general principles, mechanism of infection and the use of performance standards to control human exposure. *Int J Food Microbiol.* 2000;62(3):223-9.
94. Smith M, Takeuchi K, Anderson G, Ware G, McClure H, Raybourne R, Mytle N, Doyle M. Dose Response of *Listeria* induced Stillbirths in Non Human Primates. *Infect Immun.* 2007.
95. Williams D, Castleman J, Lee C, Mote B, Smith M. Risk of Fetal Mortality After Exposure to *Listeria monocytogenes* Based on Dose Response Data from Pregnant Guinea Pigs and Primates. *Risk Anal.* 2009;29(11):1495-505.
96. Williams D, Irvin E, Chmielewski R, Frank J. Dose-response of *Listeria monocytogenes* after oral exposure in pregnant guinea pigs. *J Food Prot.* 2007;70(5):1122-8.
97. Chen Y, Ross W, Scott V, Gombas D. *Listeria monocytogenes*: low levels equal low risk. *J Food Prot.* 2003;66(4):570-7.
98. Chen Y, Ross W, Gray M, Wiedmann M, Whiting R, Scott V. Attributing risk to *Listeria monocytogenes* subgroups: dose response in relation to genetic lineages. *J Food Prot.* 2006;69(2):335-44.
99. Yang H, Mokhtari A, Jaykus L, Morales R, Cates S, Cowen P. Consumer phase risk

- assessment for *Listeria monocytogenes* in deli meats. *Risk Anal.* 2006;26(1):89-103.
100. Low JC, Donachie W. A review of *Listeria monocytogenes* and listeriosis. *Vet J.* 1997;153(1):9-29.
101. Walker S, Archer P, Banks J. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J Appl Microbiol.* 1990;68(2):157-62.
102. Trepati M. Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas: Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona; 2002.
103. McClure P, Kelly T, Roberts T. The effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 1991;14(1):77-91.
104. Marcos A, Esteban M. Nomograph for predicting water activity of soft cheese. *J Dairy Sci.* 1982;65(9):1795-7.
105. Lebert I, Dussap CG, Lebert A. Effect of aw, controlled by the addition of solutes or by water content, on the growth of *Listeria innocua* in broth and in a gelatine model. *Int J Food Microbiol.* 2004;94(1):67-78.
106. Wimpfheimer L, Altman NS, Hotchkiss JH. Growth of *Listeria monocytogenes* Scott A, serotype 4 and competitive spoilage organisms in raw chicken packaged under modified atmospheres and in air. *Int J Food Microbiol.* 1990;11(3-4):205-14.
107. Scif G, Randazzo C, Restuccia C, Fava G, Caggia C. *Listeria innocua* growth in fresh cut mixed leafy salads packaged in modified atmosphere. *Food Control.* 2009;20(7):611-7.
108. Schoder D, Winter P, Kareem A, Baumgartner W, Wagner M. A case of sporadic ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* and its effect on contamination of raw milk and raw-milk cheeses produced in the on-farm dairy. *J Dairy Res.* 2003;70(04):395-401.
109. Nightingale K, Schukken Y, Nightingale C, Fortes E, Ho A, Her Z, Grohn Y, McDonough P, Wiedmann M. Ecology and transmission of *Listeria monocytogenes* infecting ruminants and in the farm environment. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(8):4458.
110. Gray M, Freitag N, Boor K. How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infect Immun.* 2006;74(5):2505.
111. Tasci F, Turutoglu H, Ogutcu H. Investigations of *Listeria* Species in Milk and Silage Produced in Burdur Province Kafkas. *Univ Vet Fak Derg.* 2010;16(Suppl-A):S93-S7.
112. Borucki M, Gay C, Reynolds J, McElwain K, Kim S, Call D, Knowles D. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* strains from a high-prevalence dairy farm. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(10):5893.
113. Winter P, Schilcher F, Bago Z, Schoder D, Egerbacher M, Baumgartner W, Wagner M. Clinical and histopathological aspects of naturally occurring mastitis caused by *Listeria monocytogenes* in cattle and ewes. *J Vet Med B.* 2004;51(4):176-9.
114. Rawool DB, Malik SVS, Shakuntala I, Sahare AM, Barbudde SB. Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *Int J Food Microbiol.* 2007;113(2):201-7.
115. Kersting A, Medeiros L, LeJeune J. Differences in *Listeria monocytogenes* Contamination of Rural Ohio Residences With and Without Livestock. *Foodborne Pathog Dis.* 2010;7(1):57-62.
116. Hassan L, Mohammed H, McDonough P. Farm-management and milking practices associated with the presence of *Listeria monocytogenes* in New York state dairy herds. *Prev Vet Med.* 2001;51(1-2):63-73.
117. D'Amico D, Donnelly C. Microbiological quality of raw milk used for small-scale artisan cheese production in Vermont: effect of farm characteristics and practices. *J Dairy Sci.* 2010;93(1):134-47.
118. Lake R, Hudson A, Cressey P, Gilbert S. Risk Profile: *Listeria monocytogenes* in soft cheeses *Inst Environ Sci Res.* 2005.
119. Latorre A, Van Kessel J, Karns J, Zurakowski M, Pradhan A, Zadoks R, Boor K, Schukken Y. Molecular ecology of *Listeria monocytogenes*: evidence for a reservoir in milking equipment on a dairy farm. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75(5):1315.
120. Latorre A, Van Kessel J, Karns J, Zurakowski M, Pradhan A, Boor K, Jayarao B, Houser B, Daugherty C, Schukken Y. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *J Dairy Sci.* 2010;93(6):2792-802.
121. Kousta M, Mataragas M, Skandamis P, Drosinos EH. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control.* 2010;21(6):805-15.
122. Antognoli M, Lombard J, Wagner B, McCluskey B, Van Kessel J, Karns J. Risk Factors Associated with the Presence of Viable *Listeria monocytogenes* in Bulk Tank Milk from US Dairies. *Zoonoses Public Health.* 2009;56(2):77-83.
123. Albert I, Pouillot R, Denis J. Stochastically modeling *Listeria monocytogenes* growth in farm tank milk. *Risk Anal.* 2005;25(5):1171-85.
124. Jaramillo M, Mejia L, Sepulveda U. Los quesos. Departamento de Ingeniería agrícola Universidad Nacional de Colombia. 1999.
125. Rodríguez A, Novoa C. Guía de elaboración de quesos colombianos. Suplemento ganadero. Bogotá, Banco Ganadero. 1995.
126. Beresford MR, Andrew PW, Shama G. *Listeria monocytogenes* adheres to many

- materials found in food-processing environments. *J Appl Microbiol.* 2001;90(6):1000-5.
127. Reij MW, Den Aantrekker ED. Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *Int J Food Microbiol.* 2004;91(1):1-11.
128. Mackey B, Bratchell N. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol.* 1989;9:89-94.
129. Brito J, Santos E, Arcuri E, Lange C, Brito M, Souza G, Cerqueira M, Beltran J, Call J, Liu Y. Retail survey of Brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(15):4954.
130. EC. (European Commission) Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. 1999.
131. Midelet G, Carpentier B. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(8):4015.
132. Ministerio de Salud de Colombia; Decreto 3075 de 1997 Por el cual se reglamenta parcialmente la Ley 09 de 1979 y se dictan otras disposiciones.
133. Moreno-Enriquez R, Garcia-Galaz A, Acedo-Felix E, Gonzalez-Rios H, Call J, Luchansky J, Diaz-Cinco M. Prevalence, types, and geographical distribution of *Listeria monocytogenes* from a survey of retail queso fresco and associated cheese processing plants and dairy farms in Sonora, Mexico. *J Food Prot.* 2007;70(11):2596-601.
134. Jackson V, Blair I, McDowell D, Kennedy J, Bolton D. The incidence of significant foodborne pathogens in domestic refrigerators. *Food Control.* 2007;18(4):346-51.
135. Ovca A, Jevsniak M. Maintaining a cold chain from purchase to the home and at home: consumer opinions. *Food Control.* 2009;20(2):167-72.
136. Azevedo I, Regalo M, Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Hogg T, Gibbs PA. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal. *Food Control.* 2005;16(2):121-4.
137. Nauta M. Modelling bacterial growth in quantitative microbiological risk assessment: is it possible? *Int J Food Microbiol.* 2002;73(2-3):297-304.
138. Pauly T, Tham W. Survival of *Listeria monocytogenes* in wilted and additive-treated grass silage. *Acta Vet Scand.* 2003;44(1-2):73-86.
139. Oliver S, Jayarao B, Almeida R. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. *Foodborne Pathog Dis.* 2005;2(2):115-29.
140. Lievaart J, Noordhuizen J, van Beek E, van der Beek C, van Risp A, Schenkel J, van Veersen J. The Hazard Analysis Critical Control Point's (HACCP) concept as applied to some chemical, physical and microbiological contaminants of milk on dairy farms. A prototype. *Vet Q.* 2005;27(1):21-9.
141. Jemmi T, Stephan R. *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2006;25(2):571-80.
142. LeJeune J, Rajala-Schultz P, Angulo F. Unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):93-100.
143. Codex Alimentarius. CAC/RCP 53. Código de prácticas de higiene para las frutas y hortalizas frescas. 2003.
144. Millet L, Saubusse M, Didienne R, Tessier L, Montel MC. Control of *Listeria monocytogenes* in raw-milk cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2006;108(1):105-14.
145. Ho A, Lappi V, Wiedmann M. Longitudinal monitoring of *Listeria monocytogenes* contamination patterns in a farmstead dairy processing facility. *J Dairy Sci.* 2007;90(5):2517-24.
146. Linton RH, Harper N. Survival and growth of foodborne microorganisms in processed and individually wrapped cheese slices. *J Environ Health.* 2008;70(7):31.
147. Lourenço A, Neves E, Brito L. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* from traditional cheese-dairies to in-use sanitizers. *Food Control.* 2009;20(6):585-9.
148. Kim J, Siletzky R, Kathariou S. Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74(21):6623.
149. Saubusse M, Millet L, Delbès C, Callon C, Montel MC. Application of Single Strand Conformation Polymorphism -- PCR method for distinguishing cheese bacterial communities that inhibit *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2007;116(1):126-35.
150. Gasanov U, Hughes D, Hansbro P. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev.* 2005;29(5):851-75.

## ANEXOS

**Anexo 1 Prevalencia de cada uno de los serotipos de *L. monocytogenes* provenientes de quesos en el periodo 2000 a 2009.**

Producto	Total	Departamento	Serotipo										Total	
			1/2a	1/2b	1/2c	3a	3b	3c	4a	4b	4e	4c		4d-e
Cuajada	26	Antioquia	2	4						4				10
		Distrito Capital*		1	1					9			2	13
		Valle								2		1		3
Queso campesino	401	Antioquia	10	32	21		1	1		58	38		7	168
		Caldas								1				1
		Córdoba			1									1
		Distrito Capital*	11	23	8		1	1	1	86	1	1	19	152
		Magdalena			1									1
		Meta								1				1
		Nariño	20	2						33			4	59
		Norte de Santander								1				1
		Santander								3				3
		Valle	5							7			2	14
Suero costeño	2	Antioquia		2									2	
Queso doble crema	91	Antioquia										2	2	
		Boyacá	1										1	
		Distrito Capital*	7	9	7				1	40		11	75	
		Nariño		1		1				9			11	
		Valle		1									1	2
Queso mozzarella	19	Antioquia	2						1			1	4	
		Distrito Capital*	4							9		2	15	
Queso costeño	9	Distrito Capital*		3	1				5				9	
Queso crema	3	Distrito Capital*							2			1	3	
Queso descremado	1	Distrito Capital*					1						1	
Queso pasteurizado	1	Distrito Capital*		1									1	
Queso pera	8	Distrito Capital*							8				8	
Queso de cabra	1	Valle	1										1	
<b>Total</b>	<b>562</b>		<b>63</b>	<b>79</b>	40	1	3	2	2	<b>279</b>	39	2	52	562
<b>Porcentaje</b>			11,2	14,1	7,12	0,18	0,5	0,4	0,4	49,6	6,94	0,36	9,25	

\*Bogotá, Cundinamarca  
Fuente: Invima , 2010 (4)

**Anexo 2 Muestras de queso procesadas en el Distrito Capital, Antioquia y Nariño con reporte de *L. monocytogenes*.**

Tipo de queso	Tipo de Establecimiento	Menor de 10	Negativo	NR	Positivo	Total general
<b>Quesadillo</b>	Comercialización		12	1		13
	Industria		48	2	4	54
<b>Quesillo</b>	Industria		23			23
<b>Quesito</b>	Comercialización		13		21	34
	Estab. Educativo		2	1		3
	Establ.Penitenciario			1		1
	Hogar		3	4		7
	Industria		163	16	107	286
	Restaur. comercial		7	3	39	49
<b>Queso</b>	Ancianatos				1	1
	Casino particular		2			2
	Club social				1	1
	Comercialización		1658	92	323	2073
	Estab. Educativo		32	6	6	44
	Estab. Militar		2			2
	Hogar		10	3	1	14
	Hospital		5	2		7
	Industria		423	25	28	476
	NR		15	3	2	20
<b>Queso bajo en grasa</b>	Hogar		1			1
<b>Queso fresco</b>	Club social		4			4
	Comercialización		106	15	5	126
	Estab. Educativo		6			6
	Establ.Penitenciario		4			4
	Hogar	1	27	2	2	32
	Industria		48	2	12	62
	NR		1			1
	Restaur. comercial vivienda		4	3		7
		1			1	
<b>Queso fresco: campesino</b>	Comercialización		7	2		9
	Industria		19	3		22
	Restaur. comercial		1			1
<b>Queso fresco: cuajada</b>	Comercialización		11			11
	Hogar		4			4
	Industria		17	1		18
	Restaur. comercial		1	3	2	6
<b>Queso fresco: doble crema</b>	Comercialización		8			8
	Industria		13			13
<b>Queso fresco: mozzarella</b>	Comercialización		4			4
<b>Queso parmesano</b>	Comercialización		1			1
<b>Queso semiduro y graso</b>	Industria		2			2
<b>Total general</b>		<b>1</b>	<b>2708</b>	<b>190</b>	<b>554</b>	<b>3453</b>

Fuente: UERIA,2010 (4)

### Anexo 3 Características generales de los métodos utilizados para la detección y aislamiento de *L. monocytogenes*

Método	Sensibilidad	Nivel de identificación	Dificultad <sup>1</sup>	Tiempo de enriquecimiento	Tiempo <sup>2</sup>	Disponible comercialmente	Automatización disponible	Aprobada por entidades regulatorias
Microbiológico (medios convencionales)	< 10 <sup>4</sup> células/ml	Género <i>Listeria</i> , diferenciación Bioquímica de especies	Alta	> 48 horas	3-4 días para resultados negativos y 7 días más para determinar especies	Medios deshidratados o preparados	NO	Si, es el método horizontal (Gold standard)
Inmunológico (ELISA-ELFA)	> 10 <sup>3</sup> células/ml	Género <i>Listeria</i> , pocas diferencias <i>L. monocytogenes</i>	Baja	40-48	1-2 h	SI	SI	Muchos métodos han sido aprobados <sup>3</sup>
Inmuncaptura ELISA	> 10 <sup>5</sup> células/ml	Género <i>Listeria</i> , pocas diferencias <i>L. monocytogenes</i>	Media	24-30	1-2 h	SI	SI	NO
Inmuncaptura PCR	> 10 <sup>5</sup> células/ml	Diferenciación de todas las especies, > 2 incluso subgrupos	Media	24-30	> 2	SI	NO	NO
PCR	> 10 <sup>5</sup> células/ml	Diferenciación de todas las especies, incluso Subgrupos	Baja	40-48	>2	SI	SI	Algunos aprobados
Hibridación de DNA	> 10 <sup>7</sup> células/ml	Diferenciación de todas las especies, incluso subgrupos	Baja		2-4 h	SI	SI	

<sup>1</sup>Se refiere al tiempo de ejecución de la prueba; <sup>2</sup> El tiempo que transcurre en el cual se llega al diagnóstico excluyendo el tiempo del preenriquecimiento.

<sup>3</sup>Dependen de la casa comercial y las aprobaciones pueden ser por país.

Fuente: Gasanov et al., 2005 (150).

#### **Anexo 4. Método para la enumeración de *L. monocytogenes*.**

##### **Preparación de diluciones**

Utilizar como diluyente agua peptonada tamponada o caldo base Fraser (media concentración).

Pesar 25 gramos de la muestra y adicionarla al caldo de dilución (225 ml), dilución  $10^{-1}$ .

Dejar reposar la suspensión inicial por 1 h  $\pm$  5 minutos a  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para mejorar la recuperación de los microorganismos estresados.

A partir de la primera dilución  $10^{-1}$ , una vez terminado el tiempo de incubación realizar diluciones seriadas en base 10 (el número de dilución dependerá de si se sospecha un alto o bajo número de *L. monocytogenes* en la muestra).

##### **Inoculación e incubación**

Transferir con pipeta estéril 0,1 mL de la suspensión inicial a dos placas de agar ALOA – (Agar *Listeria* Ottaviani-Agosti).

Repetir este procedimiento usando diluciones decimales consecutivas si es necesario.

Cuidadosamente esparcir el inóculo lo más pronto posible sobre la superficie del agar con asa de Drigalsky sin tocar los bordes de la placa. Dejar las placas cerradas a temperatura ambiente por 15 minutos para que el inóculo sea absorbido en el agar.

Invertir las placas y colocar en la incubadora a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por 24 h.

##### **Enumeración**

Después de la incubación por 24 horas si el desarrollo de las colonias es leve o no se observa desarrollo realizar una incubación adicional de 18 h a 24 h.

Observar la presencia de colonias presuntivas de *Listeria* spp. Las colonias en agar ALOA para *Listeria* spp dentro de las 24 horas son pequeñas y verdes debido a la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa que produce cambio de color verde - azulado en las colonias.

Las especies patógenas como *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son diferenciadas por la actividad de la fosfolipasa C, específica en el fosfatidil-inositol. Esta fosfolipasa (enzima: lecitinasa) hidroliza la lecitina en el medio produciendo un halo opaco alrededor de las colonias.

Las colonias presuntivas de *L. monocytogenes* son **azul-verdosa con un halo opaco**. Las colonias de *Listeria* spp **son azul-verdosa sin halo**. Algunas cepas de *L. monocytogenes* pueden mostrar un halo muy débil, en casos de estrés, en particular de estrés ácido. Algunas cepas de *L. monocytogenes* son caracterizadas por una lenta actividad de la fosfolipasa. Tales bacterias son detectadas cuando la duración total de incubación es mayor, por ejemplo 4 días.

Contar todas las colonias presuntivas o sospechosas de *Listeria* spp en cada placa que contiene menos de 150 de colonias características.

##### **Confirmación de *Listeria* spp**

Se deben seleccionar 5 de las colonias presuntivas o sospechosas de cada placa retenida.

Sembrar por aislamiento las colonias seleccionadas sobre la superficie seca de agar Tripton soya extracto de levadura (TSYEA), de manera que se obtengan colonias bien aisladas

Incubar las placas sembradas de 35°C a 37°C por 18 a 24 horas o hasta que el desarrollo sea satisfactorio. Si las colonias no están bien separadas traspase una colonia típica a otra placa de agar TSYEA.

Realizar las pruebas confirmativas a partir de cultivo puro en agar TSYEA.

En la prueba de **iluminación de Henry** a partir del cultivo puro en agar TSYEA, las colonias de *Listeria* spp aparecen azuladas.

### **Pruebas confirmativas**

Realizar pruebas bioquímicas que incluyen Xilosa, Ramnosa, Manitol, prueba de Campo, o el sistema API

### **Expresión de los resultados**

#### **Recuento de colonias de *L. monocytogenes***

Calcule para cada una de las placas el número de colonias  $\alpha$  de *L. monocytogenes* presentes, usando la siguiente fórmula:

$$a = b/A \times c$$

Donde:  $b$  : es el número de colonias confirmadas por el criterio de identificación  
 $A$  : es el número de colonias sometidas a confirmación  
 $C$  : es el número total de colonias características en la placa.  
Redondear a un número entero.

Multiplicar por el inverso de la dilución y por 10 como factor de corrección.  
Informar com UFC/ml o g de alimento.

### Referencias

ISO 11290-2: 01/07/1998 "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method".

ISO 11290-2: 1998 Enmienda 1: 15/10/2004 "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 2: Enumeration method".

## Anexo 5. Ficha técnica – Queso Campesino

<b>Nombre del producto</b> Queso Campesino			
Fecha vencimiento Día – mes – año			
<b>Características generales</b>			
Composición M.G. 18 – 24 %, Humedad 55 – 58 % Proteína 20 – 24 %, Sal 1,5 – 1,7 % pH 6,2 – 6,6		Estructura Sin ojos en el interior y textura lisa	
Otras Apariencia semi blanda, superficie lisa, color blanco , sabor ligeramente salado y no ácido			
<b>Características físico – químicas</b>			
pH: 6,2 – 6,4		a <sub>w</sub> : 0,98	
<b>Características microbiológicas</b>			
Aerobios Bajo	Mohos Ausencia	Coliformes Ausencia	Salmonella Ausencia
Otros: ausencia de <i>L monocytogenes</i>			
<b>Empaquetado y embalaje</b>			
Unidad Libra, Kg, bloque	Material Plástico o termoformados	Atmósfera Sin vacío Con vacío	HR 85 %
Otras Materiales impermeables, sin sabores extraños, reciclables			
<b>Etiquetado:</b> vida útil 18 días			
Ingredientes Leche Sal Cloruro de calcio Cuajo	Lote y caducidad 18 días	Instrucciones de uso Consúmase fresco	Instruc. de almacenado Almacénese refrigerado a 4°C Consúmase rápidamente después de abierto
Condiciones de almacenado en planta Refrigerado a 4°C, no mayor de ocho días			
Condiciones de distribución Higiénicas, refrigerado a 4 °C			
Otros			