

Serotipificación molecular y susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria monocytogenes*, aislada de carne y derivados de origen porcino, en el departamento del Tolima.

PAOLA ANDREA MORENO OCAMPO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ D. C.**

2013

Serotipificación molecular y susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria monocytogenes*, aislada de carne y derivados de origen porcino, en el departamento del Tolima.

PAOLA ANDREA MORENO OCAMPO

Trabajo presentado para obtener título de Magíster en Ciencias Biológicas.

Directora

Ana K. Carrascal-Camacho. Bact., M.Sc.

Co Director

Raúl A. Poutou-Piñales. BQ., M.Sc., Ph.D.

Asesora

Zulema Ruiz-Bolívar. Bact., M.Sc.

Líneas de investigación: Microorganismos Emergentes en la Industria de Alimentos y Biotecnología y Biología Molecular. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial (GBAI)

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
BOGOTÁ D. C.**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La Pontificia Universidad Javeriana no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará por qué no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

Artículo 23 de la resolución No. 13 de Julio de 1996

Serotipificación molecular y susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria monocytogenes*, aislada de carne y derivados de origen porcino, en el departamento del Tolima.

PAOLA ANDREA MORENO OCAMPO

**Dra. Ingrid Schuler PhD.
Decana Académica
Facultad de Ciencias**

**Dr. Manuel Antonio Franco MD.
PhD
Director de Posgrado
Facultad de Ciencias**

Nota de aceptación

La presente tesis fue sustentada y aprobada para el grado de Magister en Ciencias Biológicas. En constancia firman:

Jurado: Deyci Rodríguez Cordero
Facultad de Ciencias - Departamento de Microbiología
Pontificia Universidad Javeriana

Jurado: Jimmy Vargas Duarte
Instituto de Genética
Universidad Nacional de Colombia

Jurado: Oscar Castro Aguilar
Facultad de Ciencias de la Salud – Programa Medicina
Universidad del Tolima

Directora de Tesis: Ana Karina Carrascal
Facultad de Ciencias - Departamento de Microbiología
Pontificia Universidad Javeriana

“Tu tiempo es limitado, de modo que no lo malgastes viviendo la vida de alguien distinto. No quedes atrapado en el dogma, que es vivir como otros piensan que deberías vivir. No dejes que los ruidos de las opiniones de los demás acallen tu voz interior. Y lo que es más importante, ten el coraje para hacer lo que dice tu corazón y tu intuición”.

Steve Jobs

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por darme la fuerza para continuar y no morir en el intento.

A mi mamá, Martha Lily Ocampo.

Por su amor, apoyo y valores.

A Paulo José

Por su amor, compañía, fortaleza y paciencia.

A mis familiares.

A mi hermano Julio por su ejemplo de hermano mayor y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

A mis maestros

Ana Karina Carrascal, Raúl Poutou, Zulema Ruiz por su gran apoyo y motivación para la culminación de esta etapa de mi vida.

A mis amigos

A todos y cada uno los que me acompañaron durante este proceso y en la vida, los quiero aunque no parezca.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación de este trabajo de grado a través del proyecto 2008W4497-3592 MADR-UT.

A todos aquellos que no recordé al momento de escribir esto. Ustedes saben quiénes son.

Contenido

INTRODUCCIÓN	14
1. MARCO TEÓRICO	16
1. 1 Situación porcícola en Colombia	16
1. 2 Generalidades <i>Listeria</i> spp.....	17
1. 2. 1 Especies	18
1. 2. 2 Características bioquímicas	18
1. 2. 3 Serotipos.....	18
1. 2. 4 Generalidades de <i>L. monocytogenes</i>	19
1. 2. 5 Vías evolutivas.....	21
1. 2. 6 Linajes de <i>L. monocytogenes</i>	21
1. 2. 7 Virulencia	23
1. 2. 8 Ciclo de infección.....	25
1. 3 Listeriosis	26
1. 3. 1 Tipos de Listeriosis	26
1. 4 Susceptibilidad a antibióticos	28
1. 5 Brotes	29
Situación de listeriosis en Colombia	30
Prevalencia de <i>Listeria</i> en Colombia.....	31
1. 6. Contaminación de productos cárnicos por <i>L. monocytogenes</i>	32
1. 6. 1 Alimentos	34
2. OBJETIVO GENERAL	37
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3. 1 Tipo y lugar de estudio	38
3. 2 Encuesta	40

3. 3 Tamaño de muestra.....	40
3. 4 Muestreo	44
3. 5 Análisis de muestras.....	44
3. 6 Extracción de ADN	45
3. 7 Identificación molecular de género y especie (<i>L. monocytogenes</i> y <i>L. ivanovii</i>)	45
3. 8 Serotipificación molecular de <i>L. monocytogenes</i>	47
3. 9 Tolerancia a desinfectantes	49
3.10 Susceptibilidad antimicrobiana.....	50
3.11 Estadística	50
4. RESULTADOS	51
DISCUSIÓN.....	70
CONCLUSIONES	86
RECOMENDACIONES.....	88
BIBLIOGRAFÍA.....	90
ANEXOS.....	116

Contenido tablas

Tabla 1. Serotipos especies <i>Listeria</i>	19
Tabla 2. Límites de crecimiento y sobrevivencia de <i>L. monocytogenes</i>	20
Tabla 3. Resumen linajes de <i>L. monocytogenes</i>	22
Tabla 4. “Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> en cárnicos crudos en Europa y otros países ”	35
Tabla 5. “Incidencia de <i>L. monocytogenes</i> en carne cruda y productos RTE cárnicos en Estados Unidos y Canadá”	36
Tabla 6. Distribución de muestras por municipio.....	41
Tabla 7. Distribución de muestras por productos en municipios	43
Tabla 8. Juego de primer empleados en la identificación género y especie de <i>Listeria</i>	46
Tabla 9. Juego de primer empleados en la identificación de la especie <i>L. ivanovii</i>	47
Tabla 10. Juegos de “primers” empleados serotipificación molecular de <i>L. monocytogenes</i>	49
Tabla 11. Relación entre la temperatura registrada en el refrigerador y el número de establecimientos evaluados (frecuencia).....	59
Tabla 12. Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp., y <i>L. ivanovii</i> en materia prima, derivados cárnicos, ambientes y otros, aislados en la cadena porcícola del departamento de Tolima.....	62
Tabla 13. Prevalencia de aislamientos de <i>Listeria</i> spp., <i>L. monocytogenes</i> y <i>L. ivanovii</i> , en establecimientos muestreados en el Departamento del Tolima.....	63
Tabla 14. Distribución de las especies del género <i>Listeria</i> aisladas de diferentes muestras de materia prima, derivados cárnicos, ambientes y otros en el departamento del Tolima.	64
Tabla 15. Serotipos encontrados en cepas de <i>L. monocytogenes</i>	65
Tabla 16. Resultados prueba tolerancia a desinfectantes	65
Tabla 17. Resultados prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de <i>Listeria</i> spp. y <i>L. monocytogenes</i>	66

Contenido Figuras

Figura 1. Evolución del grupo de genes de virulencia (LIPI-1) en el género <i>Listeria</i>	21
Figura 2. Factores de virulencia en <i>L. monocytogenes</i>	24
Figura 3. Descripción geográfica de los municipios del departamento del Tolima	39
Figura 4. Esquema de identificación serotipos de <i>L. monocytogenes</i>	48
Figura 5. Distribución de establecimientos encuestados en cadena de comercialización.	52
Figura 6. Tipos y número de establecimientos encontrados por municipio del departamento del Tolima	53
Figura 7. Derivados cárnicos de origen porcino comercializados en establecimientos del departamento del Tolima.....	54
Figura 8. Porcentaje de realización de procesos de limpieza y desinfección en los establecimientos y fábricas de proceso de la cadena porcina del departamento del Tolima.	55
Figura 9. Tipo de desinfectantes usados en los establecimientos que realizan proceso de limpieza y desinfección.	56
Figura 10. Tipos de equipos de refrigeración usados en la industria cárnica del departamento del Tolima.	58
Figura 11. Gel de agarosa en electroforesis. Producto de PCR múltiple de género <i>Listeria</i> spp. y especie <i>L. monocytogenes</i>	61
Figura 12. Portada Cartilla.	68
Figura 13. Registro fotográfico, I Seminario Nacional de Salmonella y <i>Listeria</i> en la cadena porcina.....	69

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un microorganismo patógeno que afecta a humanos y animales, como agente causal de una de las más importantes enfermedades transmitida por alimento (ETA), denominada Listeriosis. Esta bacteria se asocia con alimentos tales como la leche, quesos, ensaladas y productos cárnicos, lo que la convierte en un problema para la industria alimentaria, en especial en la industria cárnica. En este estudio se evaluó la prevalencia de *L. monocytogenes* en el departamento del Tolima. Para ello, se analizaron 377 muestras de materia prima, derivados cárnicos de origen porcino, ambientes y manipuladores en plantas de proceso y en expendios. Para el análisis microbiológico de las muestras se aplicó el protocolo de la ISO11290-1. A los aislamientos se les aplicó serotipificación por PCR y pruebas de susceptibilidad antimicrobiana. Se obtuvieron 55 (14,5 %) aislamientos de *Listeria* spp., 5 (1,3 %) de *L. monocytogenes* y 2 (0,5 %) correspondieron a *L. ivanovii*, en los que se encontraron los serotipos 4b/4d/4e y 4a/4c, ambos hallados en materia prima, operarios manipuladores y superficies de trabajo. Los aislamientos presentaron una susceptibilidad del 100% para ampicilina, penicilina, trimetoprim/sulfatometoxazol, azitromicina, cloranfenicol, tetraciclina y vancomicina. En conclusión, se confirmó la presencia de *L. monocytogenes* en diferentes eslabones de la producción de derivados cárnicos porcinos. La presencia de *Listeria* spp. (14,5 %) evidencia serias fallas en los procesos de limpieza y desinfección. Los antibióticos de elección para el tratamiento de listeriosis en humanos presentaron una eficiencia del 100% en los aislamientos estudiados. Como resultado de este estudio se presenta el primer reporte de *Listeria* en el departamento del Tolima.

Palabras claves: *Listeria monocytogenes*, derivados cárnicos porcinos, PCR, serovariedad, susceptibilidad antimicrobiana.

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a pathogen microorganism that affects humans and animals, as an agent of one of the most important food-borne disease (FBD), denominated as listeriosis. This bacteria is associated with aliments such as milk, cheese, salads and meat products, which converts it in a problem for the alimentary industry, especially the meat industry. In this study the prevalence of *L. monocytogenes* in the department of Tolima was evaluated. For this, 377 samples of raw material, meat derivates from porcine origin, environments and manipulators in the process plant and distributors were analyzed. For the microbiological analysis of the samples the ISO11290-1 protocol was applied. Serotyping by PCR and antimicrobial susceptibility test were applied to the isolates. There were obtained 55 (14,5 %) isolates of *Listeria* spp., 5 (1,3 %) of *L. monocytogenes* and 2 (0,5 %) corresponded to *L. ivanovii*., in which the serotypes 4b/4d/4e and 4a/4c were found, both in the raw material, manipulators and work surfaces. The isolates presented a susceptibility of 100 % for ampiciline, peniciline, trimetoprim/sulfatometoxazol, azitromicine, cloranfenicol, tetraciclina and vancomicina. In conclusion, the presence of *L. monocytogenes* in different production links of meat derivates from porcine origin was confirmed. The presence of *Listeria* spp. (14,5 %) evidences serious mistakes in the cleaning and disinfection processes. The chosen antibiotics for the treatment of listeriosis in humans presented an efficiency of 100% in the studied isolates. As a result of this study, the first *Listeria* report in the department of Tolima is presented.

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un patógeno intracelular que afecta a humanos y animales, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y es transmitido al hombre por el consumo de alimentos contaminados. Este microorganismo causa un síndrome denominado listeriosis, asociado con graves brotes epidemiológicos y casos esporádicos, donde se han encontrado como vehículos: productos cárnicos (carne cruda, curada y sus derivados), lácteos (quesos, leche cruda y pasteurizada) y vegetales (1-5). Aunque esta enfermedad es de baja frecuencia, tiene una mortalidad alta (20-30 %), generando preocupación en los consumidores, autoridades sanitarias y productores de alimentos (6-9).

La listeriosis puede originar dos tipos de cuadros clínicos: uno no invasivo y otro invasivo. El no invasivo es padecido por personas que están por fuera del grupo de riesgo, originando un síndrome gastrointestinal, que en la mayoría de casos es auto limitante. La listeriosis invasiva es una infección oportunista que afecta a un grupo de riesgo específico, constituido por mujeres en embarazo, recién nacidos, ancianos y personas con sistema inmunológico comprometido (10,11). Este tipo de listeriosis es más severa pues da lugar a meningitis (fundamentalmente en el feto o en el neonato), meningoencefalitis, septicemia, aborto espontáneo e infecciones perinatales, que requieren hospitalización el 85 al 90% de los casos (12-15).

Los principales casos de listeriosis se han presentado en países industrializados, en los cuales la producción masiva de alimentos obliga a almacenarlos durante largos periodos de refrigeración, constituyendo en un problema para las empresas alimentarias, donde es necesario establecer medidas de control en plantas de proceso y establecimientos encargados de su comercialización. Las condiciones que determinan su presencia incluyen deficiencias higiénicas durante la manipulación por contaminación cruzada con

superficies de trabajo, maquinarias y equipos, entre otros (16-18). De otro lado, la capacidad de este microorganismo de crecer a temperatura de refrigeración y en condiciones extremas de pH, salinidad, incrementa el riesgo de contaminación de los alimentos (18-19).

El primer brote asociado a este microorganismo ocurrió en 1981 en “Nueva Escocia”, Canadá, por consumo de ensalada de repollo contaminada (20-22). Alimentos listos para el consumo como salchichas, jamones y otros embutidos, se han asociado como un vehículo frecuente en la transmisión de *L. monocytogenes*. Hay informes de brotes en Estados Unidos asociados al consumo de salchichas tipo “frankfurters” y jamones (23-26).

En Colombia, se han realizado varios estudios para conocer la prevalencia de *L. monocytogenes* en carne y sus derivados de origen bovino y porcino. Entre ellos se encuentra el ejecutado por la Secretaría de Salud de Bogotá, en muestras de derivados cárnicos listos para el consumo (LPC), donde se determinó que la prevalencia de *L. monocytogenes* fué del 11.2% en el periodo de tres años del estudio. Otro estudio reciente realizado por Gamboa y colaboradores 2012, en la industria cárnica porcina a nivel nacional detectaron una prevalencia de *L. monocytogenes* del 3,75 % en canales porcinas, 46,2 % en carne fresca, 8,7 % en salchicha, 6,5 % en jamón y 5,5 % en chorizo (26-28).

Para el departamento del Tolima no hay reportes de prevalencia de *L. monocytogenes* en la industria de derivados de cárnicos porcinos, siendo los más consumidos la longaniza, chorizo y salchichón. Por otro lado existen productos autóctonos del departamento del Tolima como la rellena, el tamal y la lechona, los cuales son elaborados a base de carne de cerdo pero no se denominan derivados cárnicos. La producción y comercialización de los productos derivados cárnicos porcinos no está del todo tecnificado predominando la elaboración artesanal.

1. MARCO TEÓRICO

1. 1 Situación porcícola en Colombia

Durante los últimos veinticinco años la cadena cárnica porcina colombiana, ha mostrado un desarrollo paulatino desde el punto de vista de productividad y agronegocio. Por esta razón el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), la Asociación de Porcicultores (Asoporcicultores) y los productores transformadores y comercializadores han realizado esfuerzos para desarrollar estrategias de innovación en herramientas y tecnologías para la modernización de la infraestructura, incremento de la producción, y garantía de la calidad e inocuidad de la cadena cárnica porcina, con el fin de mejorar los canales de comercialización y fomentar el consumo de carne de origen porcino (29-30).

Según el Fondo para el Financiamiento del Sector Agrícola FINAGRO (2010), China fue el país que lideró la producción mundial y a la vez el mayor consumidor de carne porcina, aportando el 53% de la producción total. Se considera que entre China, la Unión Europea y Estados Unidos se reúne el 85% de la producción mundial. Japón es el país líder en importaciones valoradas en 3.434.959 millones de dólares, hasta alcanzar el 34% de las importaciones mundiales, seguido por Rusia, Italia y Alemania (31). Los mayores exportadores de carne porcina son la Unión Europea, Estados Unidos, Canadá, Brasil y China los cuales cubren el 97% del mercado total en el mundo. En Latinoamérica se destacan Brasil y México como los mayores productores y consumidores. Colombia por su parte, ocupa el lugar número 45 en la producción mundial de carne de cerdo con el 0.18% (31).

En Colombia, el mercado de carne de origen porcino ha reflejado una dinámica fluctuante. La producción responde al consumo interno del país principalmente y a un bajo margen de exportación. Para el año 2007, Asoporcicultores reportó

un total de exportaciones de 139 toneladas que cubría animales vivos, carne, despojo y tocino, con destino al Ecuador. Este bajo margen se debió a las limitaciones presentadas por las barreras sanitarias para la Peste Porcina Clásica, para lo cual el país adelanta campañas de erradicación (32). En el plano de importaciones para el 2010 ingresaron 8.082 toneladas al país y para el mes de mayo del 2011 se habían importado 4.493 toneladas de carne de cerdo, siendo los principales proveedores Chile, Estados Unidos, y Canadá con 9849 toneladas (33). A pesar de lo expuesto, las cifras muestran un aumento del beneficio y producción comparado con años anteriores. Por ejemplo, el número de cerdos formalmente beneficiados en el año 2011 fue de 194.195 cabezas, que representa un crecimiento a razón del 4,4% con relación a las 202.740 cabezas registradas en el año 2012 (34).

El consumo aparente de carne de cerdo en el año 2010 en Colombia fue de 4.63 Kg/hab/año frente a 4,22 Kg/hab/año del 2009 mostrando un aumento del 9,7%. En comparación con la situación mundial del consumo de carne de cerdo en el año 2010 Colombia se encuentra por debajo tanto de la media mundial que es de 16 Kg/hab/año, como la media de América del Sur 9 Kg/hab/año (35).

Los factores que inciden en el consumo de carne de origen porcino son el conocimiento del producto, capacidad de compra, arraigo cultural y percepción del producto (26, 27).

1. 2 Generalidades *Listeria* spp.

El género *Listeria* recibe su nombre en reconocimiento al científico Josep Lister, conocido por la introducción de las técnicas de desinfección médica. Este género se relaciona con *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochothrix*. La disposición filogenética de *Listeria* está dada por el bajo contenido de G+C (36% a 42%), con base a la hibridación ADN-

ADN en el análisis de multilocus enzimáticos y la secuenciación del rDNA 16s (36, 37).

1. 2. 1 Especies

Actualmente el género *Listeria* cuenta con ocho especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae* (38-42). De estas *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son consideradas especies patógenas según estudios realizados en ratones, que mostraron su capacidad de colonizar en bazo e hígado (17, 43, 44).

1. 2. 2 Características bioquímicas

Las especies del género *Listeria* se caracterizan por ser catalasa positiva, oxidasa e indol negativas e hidrolizar la esculina. Se diferencian por sus características bioquímicas, las pruebas empleadas en la identificación de esta género son las de fermentar carbohidratos de D-xilosa, L-ramnosa, α -metil-D-manósido y D-manitol (45). La capacidad de producir lisis en glóbulos rojos, diferencia a *L. monocytogenes* de especies de *Listeria* no patogénicas. Las técnicas “rápidas” basadas en características genéticas o inmunológicas identifican a *Listeria* a nivel de género y especie (46, 49).

1. 2. 3 Serotipos

La clasificación de los serotipos se basa en la combinación de los antígenos somáticos (O) y flagelares (H), reportando 13 serovariedades para *L. monocytogenes* (18, 24, 36, 50). Tres de estos serotipos, 1/2 a, 1/2 b y 4b, son los que se han aislado en el 90% de los casos de listeriosis humana (51, 52). Hay serovariedades que se comparten entre especies como 1/2 b, 4ab, 4c, 4d, 6a, 6b, In^a (Tabla 1).

Tabla 1. Serotipos especies Listeria.

Especie	Serovariedad
<i>L. monocytogenes</i>	1/2 a, 1/2 b, 1/2 c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, "7"
<i>L. ivanovii</i>	5
<i>L. innocua</i>	4ab, 6a, 6b, In ^a
<i>L. welshimeri</i>	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	1/2 b, 4c, 4d, 6b, In ^a
<i>L. grayi</i>	Desconocida
<i>L. rocourtie</i>	Desconocida
<i>L. marthii</i>	Desconocida

In^a: Indefinido, tomado de Swaminathan (53)

Desde 1981, las cepas de la serovariedad 4b son responsables del 33% al 50% de casos de listeriosis en humanos a nivel mundial y de los principales brotes alimentarios las serovariedades 1/2b y 3b también se han aislado en humanos. Los aislamientos recuperados de alimentos se relacionan con el serogrupo 1/2 (54-56).

1. 2. 4 Generalidades de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes es un bacilo Grampositivo, que no presenta cápsula, no es esporulado, es anaerobio facultativo intracelular, es catalasa positiva, es psicrótrofo y es móvil a 25 °C e inmóvil a 37 °C debido a la disminución de la producción de flagelina (57, 58).

L. monocytogenes crece en un rango amplio de temperaturas que oscilan entre -1,5 °C a 45 °C (Tabla 2). A bajas temperaturas tiene un crecimiento lento (60), la congelación no reduce el tamaño de la población de este microorganismo, su sobrevivencia depende del tipo de alimento y condiciones de almacenamiento. Se interrumpe el ciclo de vida en este microorganismo cuando se somete a

temperaturas superiores a 50 °C (61). *L. monocytogenes* crece en medios de cultivo con pH 4,4 y a pH inferior de 4,2 sobrevive pero no crece (62, 63).

La actividad de agua (a_w) condiciona el crecimiento de este microorganismo, el cual puede sobrevivir a valores altos como 0,92 y bajos de 0,89 (Tabla 2) (59, 60, 63) por lo cual se debe realizar una combinación de tratamientos térmicos en el proceso de carnes curadas para mantener los alimentos libres de contaminantes (64, 65).

L. monocytogenes crece en presencia de altas concentraciones de sal 6,5% e incluso crece en cloruro sódico del 10 a 12% (p/v) durante largos períodos de exposición, favoreciendo su crecimiento en las carnes curadas como salchichas, mortadelas y jamones, entre otros (66, 67). Los límites de crecimiento y sobrevivencia de *L. monocytogenes* se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Límites de crecimiento y sobrevivencia de *L. monocytogenes*

Parámetro	Mínimo	Máximo	Sobrevivencia
Temperatura	-1,5 – 3 °C	45 °C	-18 °C
pH	4.2	9,4-9,5	3,3 – 4,2
Actividad del agua (a_w)	0,90 – 0,93	> 0,99	< 0,89
Sal (% NaCl)	< 0,5	12 – 16	> 20

Fuente: FSAI, 2005 (59)

Ácidos orgánicos, como el ácido acético, cítrico y láctico a concentraciones 0,1%, pueden inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes* (68). La actividad antilistericida de estos ácidos está relacionada con su grado de disociación (69). Partiendo de la premisa que no todos los ácidos son iguales, el ácido cítrico y láctico son menos dañinos que el ácido acético a pH semejante, el HCl es el menos efectivo de todos (36,70, 71).

1. 2. 5 Vías evolutivas

Según análisis filogenéticos basados en el RNA ribosomal 16s (RNAr 16s) y RNA ribosomal 23s (RNAr 23s), *Listeria* tiene dos grupos evolutivos (Figura 1).

En la ramificación de las especies de *Listeria* spp., ocurrió la agrupación de genes de virulencia en la isla de patogenicidad LIPI-1, donde se incorporaron las especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua* y *L. welshimeri* (8).

Las cepas de *L. ivanovii* se desarrollan en un ciclo de vida intracelular similar a *L. monocytogenes*, al tener una copia de LIPI-1.

En general ninguna subespecie de *L. monocytogenes* es benéfica para el hombre (8).

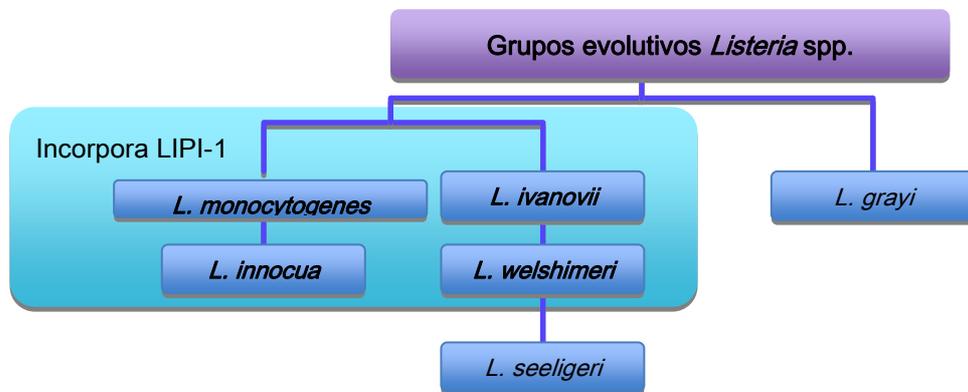


Figura 1. Evolución del grupo de genes de virulencia (LIPI-1) en el género *Listeria*. Modificado de Torres *et al.*, 2005 (8).

1. 2. 6 Linajes de *L. monocytogenes*

Análisis moleculares como ribotipificación y microarreglos, demuestran los parentescos genómicos, que permiten agrupar las cepas de *L. monocytogenes*

en grupos genéticos denominados linajes (72-74). Tradicionalmente se han identificado tres linajes (I, II, III), no obstante recientemente se reportó la existencia de un cuarto linaje (75).

En el linaje I se encuentran normalmente los serotipos 1/2 b, 3b, 4b, 4d, y 4e, aislados de brotes con origen alimentario en humanos y casos esporádicos de listeriosis (76). El linaje II comprende serotipos 1/2 a, 1/2 c, 3a y 3c, que se han aislado casos ocasionales de listeriosis en humanos (77-79). El linaje III incluye los serotipos 4a y 4c, algunos autores asignan casos atípicos del serotipo 4b a esta progenie (52). Aunque su aislamiento en animales es frecuente, se caracteriza por ser escasa en alimentos y muestras clínicas (78).

Estudios adicionales de caracterización publicaron los subgrupos IIIA, IIIB, y IIIC; donde IIIA y IIIC forman un grupo monofilogenético, asignando al subgrupo IIIB como linaje IV. Aunque el Linaje IV es reportado por Ward y colaboradores en el 2008 (80), es poca la información que se tiene de este grupo (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen linajes de *L. monocytogenes*.

LINAJE	IDENTIFICACIÓN INICIAL	SEROTIPOS	CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS	DISTRIBUCIÓN
I	Primera descripción en un MLEE estudiado por (84)	1/2 b, 3b, 3c, 4b	Menor diversidad entre los linajes; los niveles más bajos de la recombinación entre los linajes.	Frecuentemente aislado de diversas fuentes; Sobrerrepresentados entre los aislados humanos.
II	Primera descripción en un MLEE estudiado por (84)	1/2 a, 1/2 c, 3a	Mayor diversidad, alta recombinación entre niveles.	Sobrerrepresentados entre los alimentos y relacionadas con los alimentos, así como los ambientes naturales.

III	Primera descripción parcial de los análisis de secuencias por (10)	4a, 4b, 4c	Mucha diversidad; recombinación de niveles entre los linajes I y linajes II	Más aislamientos obtenidos de rumiantes.
IV	Primera descripción como IIIB usando análisis parciales de secuencias por (86); Reportado por primera vez como Linaje IV por (87)	4a, 4b, 4c	Pocos aislados analizados hasta la fecha.	Más aislamientos obtenidos de rumiantes.

Tomado de Orsi *et al.*, 2011 (24)

1. 2. 7 Virulencia

Los genes de virulencia de *L. monocytogenes* se organizan dentro de unidades genéticas conocidas como islas de patogenicidad (IPAs) (37, 8). *L. monocytogenes* es única en el grupo de patógenos transmitidos por alimentos al producir la listeriolisina O (80, 81). *L. monocytogenes* entra en la célula del hospedero, crece dentro de ella y transita a células vecinas, esta circulación evita la exposición a anticuerpos y antibióticos. Al crecer esta bacteria en células humanas se desplaza a través de la membrana intestinal permitiéndole a este microorganismo llegar a la placenta y al cerebro (37).

La patogenicidad se debe a la capacidad de *L. monocytogenes* de adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células no fagocíticas (enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células dendríticas y endoteliales) (8). *L. monocytogenes* en humanos, inicia con la ingesta del alimento contaminado, cruza la barrera intestinal, se interna y se replica en los macrófagos. Después se transporta por la sangre hacia los nodos linfáticos, hasta llegar al bazo e hígado; los microorganismos sobrevivientes se desplazan vía sanguínea hasta llegar a la placenta y al cerebro del huésped (9).

Algunos factores de virulencia son producidos por *L. monocytogenes* para facilitar el proceso invasivo. En este caso los locus de virulencia son formados por unidades transcripcionales, inicialmente la proteína reguladora *prfA* es absolutamente indispensable para la expresión de la virulencia en las especies patógenas de Listeria, la posición central está ocupada por el monocistrón *hly*, que codifica una citolisina sulfidriilo activada (listeriolisina O), requerida para la ruptura fagocitaria y la liberación en el citoplasma, prerrequisito para la proliferación de *L. monocytogenes*. La internalina es la proteína obligatoria en el inicio del proceso que está codificada por el gen *inlA*, el cual es termoregulado y tiene mayor expresión a 37 °C que a 20 °C (82).

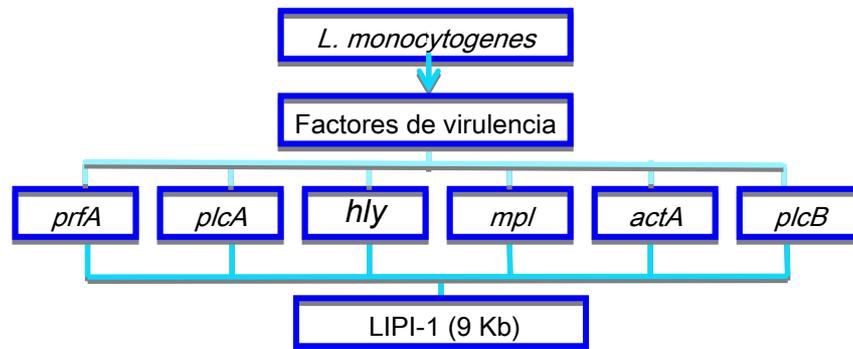


Figura 2. Factores de virulencia en *L. monocytogenes*. Modificado de Torres et al., 2005 (8)

Los responsables del parasitismo celular de *L. monocytogenes* son los factores de virulencia *prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA*, *plcB*, (Figura 2) (62).

Gen *prfA*: codifica proteínas *prfA* del factor de transcripción estructural, activador de genes de virulencia de *L. monocytogenes*, dependientes del ambiente.

Gen *plcA*: codifica la fosfolipasa C fosfatidilinositol específica (PL-PLC), ayuda a desestabilizar los fagosomas primarios.

Monocistrón *hly*: codifica una citolisina sulfidrilo activada (Listeriolisina O) requerida para la ruptura de la vacuola fagocitaria y libera la bacteria dentro del citoplasma. Una vez libres los genes reguladores del crecimiento trabajan normalmente.

Gen *mpl*: codifica proteasa *mpl*, la cual procesa extracelularmente el pro péptido inactivo de la PC-PLC.

Gen *actA*: codifica para la proteína *actA*, factor responsable de la motilidad basada en actina y diseminación célula a célula de *L. monocytogenes*.

Gen *plcB*: codifica la fosfolipasa C fosfatidilcolina específica PC-PLC que media la disolución de la doble membrana de los fagosomas secundarios formados después de la diseminación célula a célula.

(83- 86).

1. 2. 8 Ciclo de infección

Las etapas del ciclo de infección son: internalización, evasión de vacuola intracelular, nucleación de filamentos de actina y expansión de célula a célula (37,82).

En la internalización hay una adherencia a la superficie de célula eucariota, seguido por la penetración de la célula hospedera. La internalina A y la proteínas de adherencia a *Listeria* (LAP) son proteínas requeridas para la incursión a células no fagocíticas (87).

Una vez fagocitada, *L. monocytogenes*, procede la evasión de la vacuola intracelular, ésta se cubre de actina permitiendo desplazarse al interior del macrófago, para la futura diseminación, induciendo la secreción de la listeriolisina O (88).

En la nucleación de filamentos de actina y la expansión célula a célula, se activa la proteína actA. Siendo las proteínas de estrés ATPasa, clpC y clpE las que alteran la membrana vacuolar y la virulencia intracelular de *Listeria* (8,86).

1. 3 Listeriosis

Es una enfermedad transmitida por alimentos (ETA) de gran importancia en salud pública por sus implicaciones sociales y económicas, así como por sus altos costos hospitalarios (4, 11). Aunque es poco común, causa preocupación su asociación con alimentos de elaboración industrial, en especial cuando se registran brotes epidemiológicos. Los brotes de listeriosis se han dado a conocer en la tres últimas décadas por consumo de alimentos contaminados, reportado casos en todo el mundo incluyendo EE.UU., Japón, Nueva Zelanda, Alemania, Inglaterra, Francia y otros países europeos, sucediendo en países industrializados principalmente. No son claras las diferencias en los casos reportados de esta enfermedad entre los países desarrollados y países en vía de desarrollo (89, 90), según FoodNet U.S., la listeriosis es responsable del 30% de las muertes transmitidas por alimentos desde 1996 hasta 2005 mostrando una tasa de letalidad elevada del 16,9% (49, 91).

En los últimos años en Chile se han registrado brotes asociados al consumo de alimentos contaminados como ensaladas, lácteos y cárnicos en especial embutidos (92, 93, 18).

1. 3. 1 Tipos de Listeriosis

De listeriosis se describen dos tipos de cuadros: el invasivo y el no invasivo (gastroentérico), se pueden presentar desde portadores asintomáticos (2-5%) hasta individuos con signos gastrointestinales moderados a severos (44).

En los casos de listeriosis, *L. monocytogenes* se comporta de modo oportunista en personas inmunocomprometidas como consecuencia de diversos tratamientos y/o enfermedades (trasplantados, con cáncer, portadores del virus de inmunodeficiencia humana VIH, diálisis, enfermedades hepáticas, diabetes, alcoholismo y uso de medicamentos inmunosupresores) y personas mayores de 65 años, mujeres en embarazo y neonatos (53, 94, 95). Esta población es denominada grupo de riesgo cuando alguno de ellos padece listeriosis esta infección es invasiva (96, 97).

Las mujeres embarazadas son afectadas principalmente en el primer trimestre de gestación, la infección de la madre puede ser asintomática o se caracteriza por tener una patología parecida a una gripa con fiebre y dolor de cabeza; induciendo aborto espontáneo, muerte del feto, nacimiento prematuro, septicemia neonatal, meningitis e infección transplacentaria, con un período de incubación de varios días o incluso semanas. En los casos de listeriosis neonatal temprana, el lactante se infecta *in útero*, por contaminación transplacentaria (98) o durante el parto, por contaminación cruzada. Estos casos tienen una mortalidad del 30% (4).

En personas mayores de 65 años e inmunocomprometidos *L. monocytogenes* tiene un tropismo específico hacia el Sistema Nervioso Central (SNC) (14). En los casos de listeriosis existen meningitis y meningoencefalitis que pueden llegar a una tasa de mortalidad de 80%. Las infecciones en el SNC son los síndromes clínicos predominantes; otro tipo de infecciones incluyen endocarditis, infección pulmonar, artritis séptica, osteomielitis, peritonitis, hepatitis y vasculitis infecciosas, para su manifestación deben ir precedidas de bacteremia (94, 44, 5). El período de incubación es de 1 a 3 meses con un promedio de 20-30 días.

La listeriosis no invasiva se presenta como una enfermedad gastrointestinal benigna causada por consumo de alimentos contaminados con altas concentraciones $>10^{12}$ *L. monocytogenes*/g. de alimento, causa vómito, diarrea,

fiebre, dolor de cabeza y fatiga, aunque es una enfermedad auto-limitante. Los síntomas surgen entre las 18 y las 27 horas de exposición. El primer caso de gastroenteritis causado por *Listeria* fue reportado por Dalton y colaboradores en el año 1997, en el cual la posible fuente de infección fue una leche achocolatada contaminada post proceso, conservada de manera inadecuada y sin refrigeración. Este alimento fue servido en un encuentro de verano, donde aproximadamente el 75% de las personas que lo consumieron contrajeron la infección por *Listeria* (99).

Por otra parte, la infección no invasiva puede afectar a personas sin factores de riesgo conocidos pertenecientes a un campo ocupacional en específico como médicos veterinarios, zootecnistas y ordeñadores (17).

La dosis infecciosa de *L. monocytogenes* en casos transmitidos por alimentos, se ha reportado en el grupo de riesgo 10^2 células viables, este número varía entre $1,9 \times 10^5$ y 1×10^9 UFC/g o ml en una población no vulnerable (17).

Aun no es clara la relación dosis-respuesta en casos humanos, la función que desempeña la virulencia de la cepa patógena y su relación con el hospedero el cual depende de su sistema inmunológico. Llevando a considerar todos los aislamientos de *L. monocytogenes* igualmente patógenos, a pesar de los casos reportados sobre virulencia que indican las variaciones entre cepas de *Listeria* (39).

1. 4 Susceptibilidad a antibióticos

Estudios realizados en *L. monocytogenes* documentan su resistencia a uno o más antibióticos. Este microorganismo, es sensible *in vitro* a una amplia gama de antibióticos como penicilina, ampicilina, gentamicina, tetraciclinas, rifampicina y vancomicina. En cambio es resistente a cefalosporinas, quinolonas y fosfomicina (100-103).

En casos de listeriosis humana se utiliza penicilina (PEN) como tratamiento de primera elección, de ser alérgico el paciente se emplea Trimetoprim/Sulfametoxazol (TMP/SMX) (103-105), si la infección compromete el SNC la elección es ampicilina (AM). Estos antibióticos se emplean solos o combinados con aminoglucósidos como estreptomina (SM) o gentamicina (GM). También se emplean antibióticos como vancomicina (VA), eritromicina (E), tetraciclina (TE), cloranfenicol (C) y rifampicina (RIF) (106-108).

L. monocytogenes presenta resistencia natural a cefalosporinas de tercera generación y cuarta generación como: Cefotaxime (CTX), Ceftazidima (CAZ), Ceftriaxona (CRO) (109-111), razón por la que no se utilizan en el tratamiento para humanos. Incluso se ha descrito resistencia a macrólidos como eritromicina (E), fluoroquinonas: ciprofloxacina (CP), moxifloxacina (MXF), fleroxacin (FLE) y fosfomicina (FOS) (100, 112-114).

La resistencia a antibióticos, se explica por una adaptación evolutiva del material genético, el cual permite transmitir entre miembros del género *Listeria*, los genes de resistencia a antibióticos por transferencia horizontal de información genética (115). Los bacteriófagos cumplen un papel importante al brindar plasticidad durante el proceso de transferencia de información entre bacterias Gram positivas evolutivamente relacionadas como *Enterococcus* spp. (116, 117).

1. 5 Brotes

La primera descripción de la transmisión de listeriosis de manera epidémica fué en 1981 en Nueva Escocia, Canadá. La realización de un estudio de casos y controles junto con la tipificación de la cepa demostró que la fuente había sido un alimento. Durante la investigación se concluyó que una ensalada de col fue

el origen del brote, el abono empleado como fertilizante en el cultivo de esta hortaliza, contenía heces de ovejas que probablemente tenían meningitis por *Listeria*. La cosecha de coles se almacenó durante el invierno y la primavera en un contenedor refrigerado, dando las condiciones óptimas de crecimiento para *L. monocytogenes* (118, 119).

En países europeos como Francia e Italia, entre otros, se han reportado brotes de listeriosis por carne de cerdo y sus derivados (embutidos). También en Canadá en 2008, reportaron un brote asociado con productos derivados cárnicos LPC (salchichas y jamón) (120).

Situación de listeriosis en Colombia

En la actualidad, han documentado casos de listeriosis en el país, en personas con un estado inmunológico deficiente a causa del VIH sida, terapias inmunosupresoras, cáncer y trasplantes. No obstante, los casos de listeriosis en Colombia no son diagnosticados por no tener una completa documentación impidiendo obtener información para una base de datos epidemiológica representativa. Son escasos los reportes de listeriosis, pues no es frecuente el determinación del patógeno que lo origina (*L. monocytogenes*) por el Sistema Nacional de Salud. Impidiendo la relación de los casos clínicos con el consumo de alimentos contaminados generando un subregistro epidemiológico.

Uno de los estudios epidemiológicos más reconocidos fue realizado en 1994 en un hospital de tercer nivel en la ciudad de Cali, donde reportaron 19 casos clínicos de listeriosis: 10 en adultos inmunocomprometidos, 2 en mujeres en embarazo, 6 neonatos y un caso aislado de un adolescente de doce años (121).

El Ministerio de la Protección Social en el 2009 reportó un caso, de meningitis en el departamento de Antioquia, relacionado con el consumo queso fresco contaminado con *L. monocytogenes* en un niño de 10 años (123).

En el 2011 Zúñiga y colaboradores, reportaron el primer caso descrito de abscesos cerebrales múltiples, causados por *L. monocytogenes* en una paciente portadora del VIH, originaria de Cartago, Valle del Cauca (122).

Prevalencia de Listeria en Colombia

En Colombia, la búsqueda de *L. monocytogenes* se enfocó en derivados lácteos y cárnicos, siendo Bogotá donde hay el mayor número de reportes publicados. La Secretaría Distrital de Salud de Bogotá determinó la frecuencia de *L. monocytogenes* en derivados lácteos que en el 2001 fue del 10% y en el 2002 llegó al 7% (123). Los alimentos vinculados a la contaminación fueron la crema de leche y los quesos. Un estudio relacionado con factores de riesgo asociados a *L. monocytogenes*, realizado en plantas de proceso de industria cárnica, reportó una prevalencia del 11,46% (120). Otro estudio en la industria cárnica colombiana fue el realizado por Gamboa en el 2012, el cual reporta una prevalencia del 13,82% en canales, cortes y derivados cárnicos porcinos (28).

A pesar de las limitaciones, la Secretaría de Salud de Bogotá determinó que la prevalencia de *L. monocytogenes* en derivados cárnicos procesados listos para el consumo es del 11,2 %, En otros alimentos como quesos la incidencia es del 29,6% y en leche no pasteurizada es del 16% (27, 26, 124,125).

1. 6. Contaminación de productos cárnicos por *L. monocytogenes*

L. monocytogenes ingresa a las plantas de derivados cárnicos por medio de múltiples vehículos que incluyen carros transportadores, en prendas de vestir, materia prima contaminada, animales infectados y portadores humanos (126, 127). Durante el proceso de beneficio, los equipos utilizados pueden convertirse en vehículos para la propagación del patógeno, pues del 11 al 52% de los animales sanos son portadores asintomáticos de *L. monocytogenes* (128). Por las razones anteriores, la bacteria coloniza fácilmente las manos de los trabajadores, llegando así a zonas limpias o no de los beneficiaderos.

El crecimiento de *Listeria* se favorece por la humedad elevada y gran cantidad de nutrientes presentes en plantas procesadoras de alimentos. La bacteria se puede encontrar fácilmente en desagües, puntos con agua estancada, suelos, superficies y elementos de trabajo (incluyendo el acero inoxidable, vidrio y caucho) (16).

Aunque los alimentos son sometidos a tratamientos térmicos que impiden la sobrevivencia de *L. monocytogenes* pueden llegar a contaminarse post proceso pues es difícil la eliminación total de este microorganismo en plantas de proceso por la formación de “biofilm” y su adherencia a superficies de contacto con alimentos, en áreas de difíciles de limpiar (17).

La formación de biopelículas por *L. monocytogenes* es de importancia crucial en la industria alimentaria ya que esta bacteria puede ser la causante del 40,5% de los brotes asociados con infección de origen alimentario por contaminación de equipos según un estudio realizado en Francia (119, 129, 130, 131).

Otros estudios sugieren que el serotipo 1/2c es el de mayor capacidad de formación de biopelículas en acero inoxidable en relación con otros serotipos de *L. monocytogenes* (16).

La formación de la biopelícula le permite a este microorganismo sobrevivir y multiplicarse. Entre los factores que promueven la formación se encuentran la asociación con otras bacterias además de factores intrínsecos y extrínsecos del alimento (132-134). *L. monocytogenes* se asocia con otras bacterias para formar nichos ecológicos como con *Pseudomonas* y especialmente con cepas psicótrofas con alta tasa de multiplicación. Ya en el alimento su crecimiento lo determinan las características intrínsecas del producto (a_w , contenido de grasa, Eh y pH) y las extrínsecas (humedad relativa y temperatura de almacenamiento) (135, 136).

Las biopelículas se forman en lugares de difícil acceso, ya que en la realización de la limpieza y desinfección no se llega a estos puntos, generando acumulación de residuos orgánicos, los cuales junto a condiciones ambientales favorables permite la formación y crecimiento de colonias de microorganismos estructurando la matriz de la biopelícula. Estos conglomerados de microorganismos crean resistencias a desinfectantes y antisépticos empleados en la industria (137), por esta razón se recomiendan limpiezas periódicas con diferentes desinfectantes con el fin de eliminar la contaminación de los alimentos durante la etapa de elaboración (138).

La adherencia de estos conglomerados suelen hacerse en superficies de equipos usados durante la manipulación, procesamiento y almacenamiento del producto; siendo los puntos muertos, válvulas, uniones, equipos corroídos, grietas y orificios los lugares más propensos para la formación de biopelículas. (139).

1. 6. 1 Alimentos

L. monocytogenes se ha aislado en diferentes alimentos incluyendo leche y sus derivados, vegetales, carnes procesadas y sin procesar (140-144). Las Tablas 4 y 5 muestran la incidencia de *L. monocytogenes* en carnes y derivados cárnicos porcinos en países industrializados de Europa, Estados Unidos y Canadá, entre otros.

Los alimentos LPC, como derivados cárnicos, incluyendo a los de origen porcino tienen un riesgo elevado de contaminarse con *Listeria*, convirtiéndose en un riesgo para la población susceptible (145, 146). Estos alimentos durante su elaboración pasan por un proceso térmico inicial con altas temperaturas en salmuera y posterior refrigeración antes de ser envasados, lo que proporciona un entorno óptimo, sin competencia con otras bacterias por su alta tolerancia a elevadas concentraciones de sal y a las bajas temperaturas. El 20% de los cuartos fríos y refrigeradores en plantas de proceso y expendios presentan temperaturas $<10^{\circ}\text{C}$, esta refrigeración no garantiza la inocuidad de los alimentos LPC, por el contrario brinda un ambiente apropiado para que *L. monocytogenes* prevalezca sobre otros patógenos mesófilos (17, 147, 148)

Tabla 4. “Incidencia de *L. monocytogenes* en cárnicos crudos en Europa y otros países ”

País	Producto	Número de muestras analizadas	Porcentaje de muestras positivas		Referencia
			<i>Listeria</i> spp.	<i>L.m.</i>	
Australia	Cerdo	50	30	10	149
Bélgica	Morcilla preempacada	137	-	8.8	150
	Otras carnes envasadas, 25 g	199	-	8	150
	Jamón crudo, 25 g	169	-	11.8	150
	Tocino de cerdo, 25 g	153	-	18.3	150
	Productos cárnicos con materias primas curadas 25 g/0.1 g	824	-	13.7/5.8 ^a	150
Bosnia /Herzegovina	Cerdo	50	18	8	151
Bulgaria	Carne de vaca y de cerdo	234	8		152
China	Cerdo	25	60	28	153
Alemania	Productos cárnicos en conserva sin tratamiento térmico 25 g	335	-	108	154
	Productos cárnicos tratados con calor, 25 g	772	-	5	154
	Carne cruda , 25 g	343	-	30.9	154
Alemania	Carne picada	21	-	52	155
	Rinderhack (carne molida)	59	-	46	155
Grecia	Salchichas	8	2	-	156
Irlanda	Cerdo	45	3	-	157
	Chorizo	20	65	1	157
Italia	Cerdo	19	53	-	158
	Cerdo	67	33	16	159
	Cerdo	153	35	16	160
Japón	Cerdo	18	61	39	161
	Cerdo molido	6	100	67	161
Korea	Cerdo	20	4	1	162
España	Carne picada	88	62	16	163

	Carne de cerdo cruda	5	2	0	164
Suiza	Carne de res	18	33	15	165
	Cerdo	31	45	3	165
	Jamón crudo	19	11	0	165
Taiwan	Cerdo	34	-	59	166
Trinidad	Cerdo	71	1	0	167
Reino Unido	Chorizo de cerdo	59	-	49	168
	Cerdo	32	59	29	169
	Cerdo	794	4	-	170

Tabla 5. “Incidencia de *L. monocytogenes* en carne cruda y productos RTE cárnicos en Estados Unidos y Canadá”.

Producto	Número de muestras analizadas	Porcentaje de muestras positivas		<i>Listeria</i> spp. (CFU/g)	Referencia
		<i>Listeria</i> spp	<i>L.m.</i>		
Cerdo asado	50	6	5	10 ^b	171
Asado molido	20	30	25	4-240	172
Chorizo de cerdo	17	24	6	240-21,000	172
Tienda de musculo entero empacado	135	ND	0	-	173
Músculo de cerdo empacado entero	96	28.1	14.6	-	174
Músculo entero mejorado de cerdo	96	25	14.6	-	174
Tienda de carne fresca molida y embutidos	96	61.5	22.9	-	174
Cerdo molido an/or cerdo	120	47.5	26.7	-	174
Carne de cerdo molida envasada	340	-	50.2	51.9	175
Tejidos de cerdos	1.849	-	2.4	2.8	175
Cerdo molido	19	100	95	-	176
Chorizo, 1998/1999	5	-	1.2/0.4	-	177

. *Tomado de: http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/rec_pr.htm.

2. OBJETIVO GENERAL

Establecer la presencia de *L. monocytogenes*, identificando molecularmente aislamientos de derivados cárnicos porcinos en el departamento del Tolima.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Serotipificar molecularmente los aislamientos confirmados de *L. monocytogenes*.
- Evaluar la resistencia antimicrobiana de los aislamientos de *L. monocytogenes* provenientes de la industria cárnica en el Departamento del Tolima.
- Diseñar un plan estratégico de control y prevención relacionado con los factores de riesgo asociados a la presencia de *L. monocytogenes* en la cadena de producción de derivados cárnicos porcinos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio hace parte del programa “Inocuidad de la carne porcina y sus derivados: Evaluación del estatus sanitario” contrato número 2008W4497-3592 de Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR) – Universidad del Tolima (UT).

El presente estudio se realizó en cumplimiento de los objetivos específicos planteados en el proyecto los cuales son: *“Determinar la prevalencia de Listeria monocytogenes en derivados cárnicos porcinos del Departamento del Tolima”*; *“Detectar los perfiles de resistencia a los agentes antimicrobianos de las cepas de L. monocytogenes en derivados cárnicos porcinos del Departamento del Tolima”*; *“Evaluar los puntos críticos y factores de riesgo asociados a la contaminación por L. monocytogenes de acuerdo con las prácticas de la región”*; *“Socializar y divulgar los resultados del proyecto a la comunidad científica, productores, empresarios y consumidores”*.

3. 1 Tipo y lugar de estudio

En Colombia la explotación porcícola tecnificada se encuentra dividida por regiones una de ellas es la región central que incluye los departamentos de Cundinamarca, Boyacá, Meta y Tolima que representa el 22.92% de la producción nacional, ocupando el tercer lugar, precedida por la región Antioquía (35.55%) y la región occidental (27.93%) (33).

El departamento del Tolima cuenta con 47 municipios, de los cuales 13 fueron objeto de este estudio. Según el Instituto colombiano Agustín Codazzi (IGAC) la temperatura mínima es de 15,4 °C y máxima de 29,1 °C, la humedad relativa fluctúa entre 61% y 87% y las alturas de los municipios van desde 238

msnm a 2270 msnm, parámetros que se discutirán más adelante, asociados a la presencia de *L. monocytogenes*.

Este estudio fué de tipo descriptivo. Se llevó a cabo en 13 municipios del departamento del Tolima, seleccionados según los criterios de volumen de comercialización y población reconocida como consumidora tradicional de derivados cárnicos de origen porcino. En reunión con el INVIMA y Secretaría de Salud Departamental, se definieron los siguientes municipios: Armero Guayabal, Cajamarca, Chaparral, Espinal, Guamo, Ibagué, Lérica, Líbano, Mariquita, Prado, Purificación, Venadillo y Villahermosa (Figura 3).

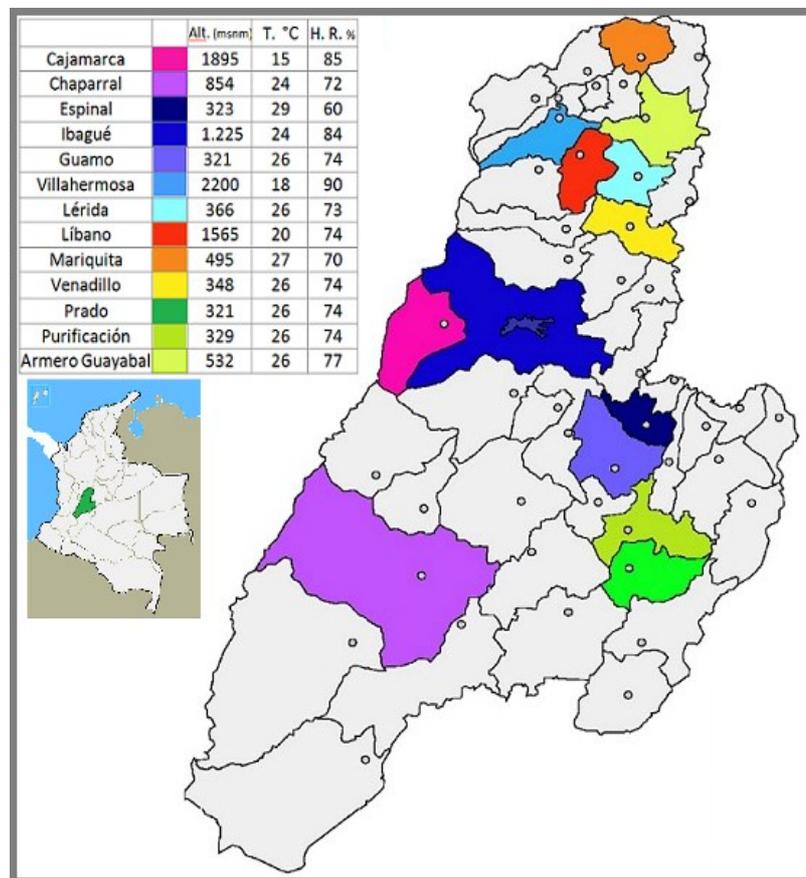


Figura 3. Descripción geográfica de los municipios del departamento del Tolima (modificado del IGAC)

3. 2 Encuesta

Una vez seleccionados los municipios del estudio se aplicó una encuesta pre-codificada (Anexo 1) con el fin de identificar el tipo de establecimiento dedicado a la producción y/o comercialización de derivados cárnicos porcinos, así como el tipo de derivados comercializados en el departamento del Tolima.

La encuesta se aplicó entre Junio de 2009 y Agosto de 2010 (14 meses). Se realizaron un total de 207 encuestas, que se distribuyeron en: plantas de derivados cárnicos, salsamentarias, expendio de carne con derivado, expendio de carne sin derivado y expendio de derivados artesanales. En la encuesta se realizaron preguntas que permitieron evaluar los siguientes parámetros: I) Condiciones higiénico-sanitarias; II) Calidad del agua; III) Limpieza y desinfección de superficies y utensilios ¿cada cuánto? y ¿con qué?; IV) Temperatura de almacenamiento; V) Control de plagas y VI) Condiciones ambientales.

3. 3 Tamaño de muestra

Para determinar el número de muestras representativas necesarias, en este estudio se empleó el programa estadístico tamaño de muestra 1.5, con una prevalencia esperada del 14% y un error esperado del 5% (27, 178). El programa arrojó un total de 377 muestras de derivados cárnicos, materias primas y ambientes para tomarlos en 120 establecimientos y 5 plantas de proceso. El número de muestras incluidas en cada punto se tomó a través de un muestreo estratificado simple, basado en el volumen semanal de comercialización de derivados porcinos objeto de este estudio (Tabla 6)

Tabla 6. Distribución de muestras por municipio.

Municipio	No. Establecimiento	No. Muestras
Armero- Guayabal	4	8
Cajamarca	2	4
Chaparral	5	31
Espinal	10	39
Guamo	6	7
Ibagué	70	208
Lérida	3	17
Líbano	5	16
Mariquita	4	24
Prado	2	4
Purificación	9	11
Venadillo	4	6
Villahermosa	1	2
Total	125	377

Las muestras colectadas se clasificaron y se codificaron de acuerdo al origen (Municipio y tipo de establecimiento), materia prima, tipo de derivado (chorizo, longaniza, jamón, salchicha, salchichón, rellena y mortadela), superficies (sifones, cortinas, canastas, refrigerador y mesones), utensilios (bandejas, cuchillos y chairas) y otros como muestra de materia fecal de manipuladores. En la tabla 7 se resume la distribución de las muestras. Es importante aclarar que las muestras variaron en función de los productos comercializados en cada punto, en el caso de las muestras de manipuladores estas se tomaron en las plantas procesadoras de derivados cárnicos y en las salsamentarias donde se permitió recolectar esta muestra.

Para el caso de derivados cárnicos y materia prima se tomaron muestras de 500 g, provenientes del mismo lote. Los utensilios que se muestrearon incluyeron: cuchillos, chairas, bandejas; las muestras se tomaron siguiendo el protocolo descrito en el anexo 2. Los equipos se muestreados fundamentalmente en plantas de derivados y salsamentarias, incluyeron:

tajadora, cutter, neveras y básculas. Adicionalmente, se tomaron muestras de superficies de contacto directo como: mesones, tablas, canastas, así como superficies de no contacto que incluyeron: cortinas, sifones, pisos. El criterio de selección de estos lugares se basó en estudios previos (16)

Tabla 7. Distribución de muestras por productos en municipios

	Armero-Guayabal	Purificación	Prado	Venadillo	Mariquita	Libano	Lérida	Villahermosa	Guamo	Ibagué	Espinal	Chaparral	Cajamarca	Total
Chorizo	2	4		2	5	6	4	2		17	7	6	4	59
Longaniza						4	5			34	4			47
Jamón										13	1	3		17
Salchicha						4	2			11	4	5		26
Rellena	6	7	4	4	5				7	12	8			53
Mortadela										1				1
Salchichón										2				2
Materia prima										26				26
Utensilios					4	1	3			26		1		35
Superficies					4	1	3			20	4	5		37
Equipos					1					29	4	4		38
otros					5					17	7	7		36
Total	8	11	4	6	24	16	17	2	7	208	39	31	4	377

3. 4 Muestreo

Partiendo de los datos antes mencionados, se realizó el muestreo correspondiente en los establecimientos seleccionados. Las muestras se tomaron bajo condiciones asépticas y se conservaron en refrigeración hasta su procesamiento en el Laboratorio de Microbiología, del Grupo GEBIUT de la Facultad de Ciencias Básicas de la Universidad del Tolima, para realizar la identificación microbiológica de *L. monocytogenes* (Anexo 2).

3. 5 Análisis de muestras

Con el fin de aislar *L. monocytogenes* se empleó el método horizontal de detección ISO 11290-1. Se pesaron 25 gramos de la muestra y se adicionaron a 225 ml de Caldo FRASER (semi) ©Merck. Se incubó durante 24 ± 2 h a 30°C . Posteriormente se realizó un enriquecimiento secundario tomando 0.1 ml de cultivo y se adicionó en 10 ml de caldo Fraser completo ©Merck y se incubó a 37°C durante 48 ± 2 h. Terminado este período se realizó un aislamiento en Agar base PALCAM OXOID y Agar Ottaviani-Agosti ©Merck con incubación a 37°C durante 48 ± 2 h. Las colonias presuntivas de *L. monocytogenes* se inocularon en Agar TSAYE, se incubaron a 37°C entre 18 y 24 h.

A las colonias aisladas se les realizaron las pruebas de catalasa, Gram e iluminación de Henry para determinar presuntivamente el género y especie. Para confirmar la especie "*monocytogenes*" se realizaron las pruebas de hemólisis, fermentación de azúcares y test de Camp (179-181). Como control positivo se utilizó la cepa de *L. monocytogenes* (ATCC 19115).

Los aislamientos presuntivos para *L. monocytogenes* fueron trasladados al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana, donde se crioconservaron en glicerol al 10% (v/v) y -20°C para la formación de un Banco de Células Primario (BCP), con el fin de realizar su identificación molecular (182).

3. 6 Extracción de ADN

Los aislamientos provenientes del BCP, se cultivaron en caldo BHI suplementado con 0,5% (p/v) de glucosa, durante 24 horas a 37°C y 140 rpm. Se tomó 1 ml de este cultivo y se centrifugó por 10 minutos a 3000 rpm en centrifuga SIGMA 3-18K. Para la extracción del DNA genómico, se usó el kit Pure Link™ Genomic DNA Purification Kit (Invitrogen), siguiendo las indicaciones de la casa comercial. La cuantificación del DNA se realizó usando el NanoDrop 2000c Thermo Scientific a 260 nm, 280 nm, 320 nm.

3. 7 Identificación molecular de género y especie (*L. monocytogenes* y *L. ivanovii*)

Para la identificación molecular de género “Listeria” y la especie “monocytogenes”, se empleó la técnica de PCR descrita por Bansal (183); Burbano (184); Poutou (178). Se amplificó un fragmento de 936 pb, donde se usaron dos iniciadores (L1 y U1), correspondientes a la subunidad RNA 16s y un juego de iniciadores (LF y LR) que amplifican una banda de 750 pb del gen *hyIA* (listeriolisina O) específica de la especie (Tabla 8). El volumen utilizado en la reacción fue de 35 µl conteniendo tampón de PCR 1X; 2,5 µl de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP; 20 µmol de cada iniciador, 2U de GotaqFlexi DNApol

(PROMEGA) y 5 µl de ADN genómico (~100ng). En la tabla 8 se presentan los primers empleados para desarrollar esta metodología.

Tabla 8. Juego de primer empleados en la identificación género y especie de *Listeria*.

Juego de Primers	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Talla producto (pb)	Condiciones de amplificaciones partida en caliente; (detalles del ciclo) números de ciclos; extensión final	Especificidad	Ref.
L1/U1 [∇]	CTCCATAA AGGTGACC CT	CAGCMGCCG CGGTAA TWC	938	95°C x 1'; (94°C x 30s, 51°C x 20s, 72°C x 30s) ₄₀ ; 72°C x 8'	Género (16S rDNA)	178, 183
LF/LR [∇]	CAAACGTT AACAACGC AGTA	TCCAGAGTG ATCGATGTTA A	750		Especie (<i>hlyA</i>)	

Condiciones de las electroforesis [∇]: 1% (p/v) gel de agarosa gel en tampón TAE 1X (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH 8.0 ± 0.2), 120 volts, 1h. Los marcadores de talla molecular utilizados fueron el 100bp Ladder y el λ DNA-HindIII (Promega). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (5 mg/ml).

En la identificación de *L. ivanovii* el volumen final de la reacción es 25 µl. En 100 ng de cada primer (Tabla 9), 200 µM de cada dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, buffer de PCR 1X, 50 ng de DNA y 1,5 U Taq polimerasa (185).

Tabla 9. Juego de primer empleados en la identificación de la especie *L. ivanovii*.

Juego de Primers	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Talla producto (pb)	Condiciones de amplificaciones partida en caliente; (detalles del ciclo) números de ciclos; extensión final	Ref.
<i>Iva I</i>	CTA CTC AAG CGC AAG CGG CAC		1100 pb	35 ciclos (95°C x 15s, 62°C x 30s, 72°C x 50s)	185
<i>Lis1B</i>		TTA TAC GCG ACC GAA GCC AAC			

Condiciones de las electroforesis: 1% (p/v) gel de agarosa gel en tampón TAE 1X (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA pH 8.0 ± 0.2), 120 volts, 1h. Los marcadores de talla molecular utilizados fueron el 1000pb Ladder y el λ DNA-HindIII (Promega). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (5 mg/ml).

3. 8 Serotipificación molecular de *L. monocytogenes*

La serotipificación de las cepas positivas de *L. monocytogenes* se realizó mediante una PCR, empleando los iniciadores D1 y D2. Según su tamaño de amplificación se clasificó el linaje, consecutivamente asignando la serovariedad (38, 94, 186). El procedimiento llevado a cabo se explica en la figura 4. En la tabla 10 se muestran los primers utilizados en la serotipificación.

El iniciador D1 amplifica una banda de 214 pb. De revelarse la banda el aislamiento puede pertenecer al linaje I (serovariedades 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4e) y linaje III (serovariedades 4a y 4c). La muestra se corre con el primer GLT, si amplifica corresponde a las serovariedades 1/2b o 3b, de no evidenciarse la banda el aislamiento se enfrenta con el primer MAMA-C (268 pb), al generar producto de 268 pb se infiere que la serovariedades que corresponden son 4a ó 4c, de no hacerse evidente se infiere que la serovariedad a la cual corresponde es 4b o 4d o 4e (Tabla 10).

El juego de primers D2 (140 pb) registra cepas pertenecientes al linaje II (serovariedades 1/2a, 1/2c, 3a, 3c) de existir amplificación se corren con el juego de primer FlaA; generando una banda de 538 pb característica de los serotipos 1/2a y 3a, la no presencia de banda corresponde a los serotipos 1/2c o 3C (Figura 4).

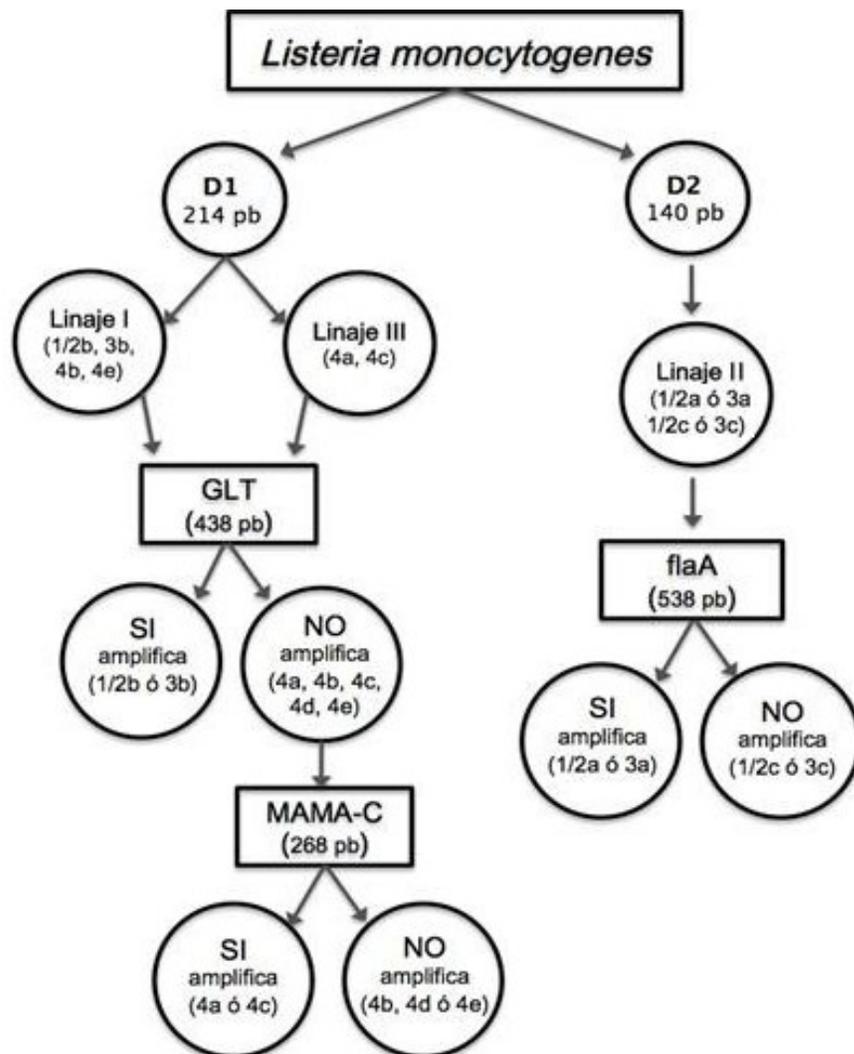


Figura 4. Esquema de identificación serotipos de *L. monocytogenes*, modificado de Borucki & Call, 2003 (94).

Tabla 10. Juegos de “primers” empleados serotipificación molecular de *L. monocytogenes*.

Juego de Primers	Secuencia sentido	Secuencia antisentido	Talla producto (pb)	Condiciones de amplificaciones partida en caliente; (detalles del ciclo) números de ciclos; extensión final	Especificidad
D1*	CGATATTTT ATCTACTTT GTCA	TTGCTCCA AAGCAGGG CAT	214	95°C x 3'; (95°C x 30s; 59°C x 30s; 72°C x 1') ₂₅ ; 72°C x 10'	División I o III
D2*	GCGGAGAA AGCTATCG CA	TTGTTCAAA CATAGGG CTA	140	95°C x 3'; (95°C x 30s; 59°C x 30s; 72°C x 1') ₂₅ ; 72°C x 10'	División II
FlaA [♣]	TTACTAGAT CAAACCTGC TCC	AAGAAAAG CCCCTCGT CC	538	95°C x 3'; (95°C x 30s; 54°C x 30s; 72°C x 1') ₂₅ ; 72°C x 10'	Serotipos 1/2a y 3a
GLT [♣]	AAAGTGAG TTCTTACG AGATTT	AATTAGGA AATCGACC TTCT	483	95°C x 3'; (95°C x 30s; 45°C x 30s; 72°C x 1') ₂₅ ; 72°C x 10'	Serotipos 1/2b y 3b
MAMA-C*	CAGTTGCA AGCGCTTG GAGT	GTAAGTCT CCGAGGTT GCAA	268	95°C x 10'; (95°C x 30s; 55°C x 1', 72°C x 1') ₄₀ ; 72°C x 10'	Serotipos 4a y 4c

Condiciones de las electroforesis. *: 2% (p/v) gel de agarosa en tampón TAE 1X. [♣]: 1.2 (p/v) gel de agarosa en tampón TAE 1X. Los marcadores de talla molecular utilizados fueron el 100bp Ladder y el λ DNA-HindIII (Promega). Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio (5 mg/ml).

3. 9 Tolerancia a desinfectantes

Para el estudio *in vitro* de desinfectantes se utilizó Alquil Dimetil Bencil Cloruro de Amonio (ADCA) a diferentes concentraciones (v/v): 0,5%; 2,0% y 3,0% (v/v). De la misma manera, se utilizó el ácido peracético (AP) a las concentraciones (v/v) de 0,5% y 1,0% (v/v). Los tiempos de contacto fueron 5 y 15 minutos respectivamente, utilizándose la prueba de tolerancia a desinfectantes descrita en la Norma Técnica Colombiana-5150 (187).

3.10 Susceptibilidad antimicrobiana

Se evaluaron todos los aislamientos mediante la técnica de microdilución en caldo (MicroScan System) según lineamientos de Clinical Laboratory Standards Institute (104) para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*. A partir de un cultivo puro se realizó una suspensión celular equivalente al tubo 0,5 en la escala de McFarland en sangre lisada de caballo, esta suspensión fue inoculada en el panel de MICroSTREP plus®3 de SIEMENS, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los paneles fueron incubados a 35°C durante 24h, para su lectura. Los resultados se analizaron empleando el programa Whonet 5.6 (2010), para obtener la estadística descriptiva (186).

3.11 Estadística

Se realizó un a como tipo de establecimiento, calidad de agua, proceso de limpieza y desinfección, material zona de trabajo y tipo de cadena de frío. Para la determinación de la prevalencia de *L. monocytogenes* se utilizó la siguiente fórmula: (188)

$$\text{Prevalencia:} \quad (1) \quad \left[\frac{\text{No. Casos prevalentes}}{\text{No. Población muestreada}} \right] \times 100 \quad (189, 190)$$

4. RESULTADOS

En la primera etapa de este estudio se aplicaron encuestas con el fin de conocer el estado actual de las condiciones higiénicas sanitarias de los eslabones de transformación y comercialización de la cadena porcina, en el departamento del Tolima.

Dentro de los trece municipios seleccionados se encuestaron 207 establecimientos entre plantas de procesos y expendios de carne porcina con sus derivados, como resultado de las encuestas realizadas se encontró que en estos establecimientos se comercializaron mensualmente 1.868 canales de cerdo y 1056 se registraron en las plantas de beneficio, para el mismo período.

En Ibagué, se observó que se distribuyen cerca de 350 canales/semana, de las cuales la planta de beneficio y el distribuidor autorizado aportan el 32% de las canales comercializadas. El 59% de estas canales ingresan de otros departamentos y el 9% restante pertenece al comercio ilegal, factor de riesgo que puede afectar la inocuidad de la carne al no tener controles sanitarios establecidos. En este municipio se encontraron la totalidad de las plantas de proceso evaluadas, , inicialmente la encuesta estableció que existían 7 plantas procesadoras. No obstante al momento del muestreo solo se encontraron activas cinco plantas. El cierre de dos plantas se debió por un lado a la crisis por la gripa AH1N1 que impactó de manera negativa el comercio de productos porcícolas; y por el otro el INVIMA selló los establecimientos por no cumplir con los mínimos de la reglamentación

Encuestas

Inicialmente en el estudio se realizaron las encuestas en los 13 municipios seleccionados los cuales se distribuyeron en 43 expendios de derivados artesanales, 35 salsamentarias, 66 expendios de derivados cárnicos de origen porcino, 56 expendios que sólo comercializan carne de cerdo y 7 plantas de proceso, para un total de 207 encuestas realizadas (Figura 5).

El municipio con mayor número de expendios fue Ibagué, dato que era de esperarse por ser la capital del departamento y tener el mayor número de habitantes (532.034) DANE, 2005.

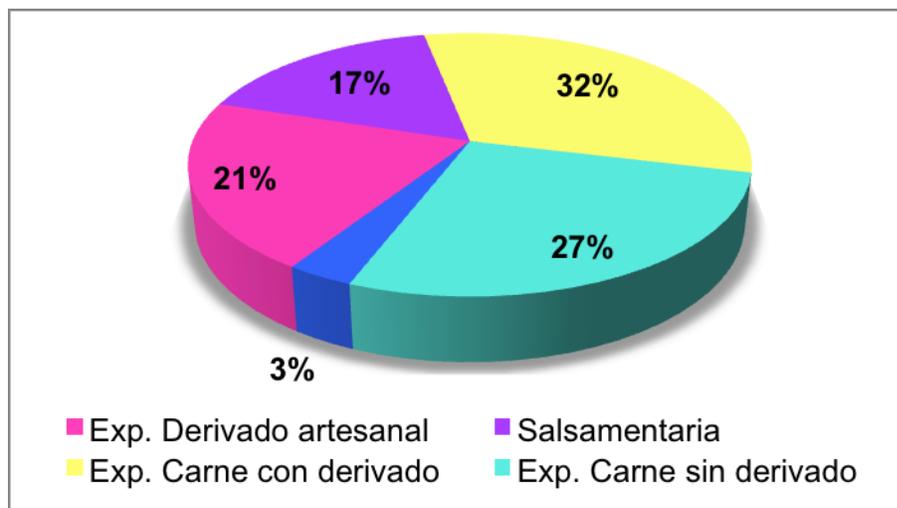


Figura 5. Distribución de establecimientos encuestados en cadena de comercialización.

Los tipos de establecimientos encontrados y el número de establecimientos variaron según el municipio (Figura 6). El municipio con mayor presencia de establecimientos comerciales fue Ibagué, donde se evidenció que los lugares más frecuentes de comercialización fueron: expendios de carne con comercialización de derivados, expendios de carne sin comercialización de

derivados y salsamentarias. Seguido por los municipios de Purificación y Espinal, donde la distribución de lugares de comercialización fue similar a la obtenida en el municipio de Ibagué. En el resto de municipios variaron entre tipos de establecimientos (Figura 6). La mayoría de los establecimientos encuestados se localizan en plazas de mercado, donde los productos comercializados son en su mayoría elaborados artesanalmente, factor que puede afectar su inocuidad.

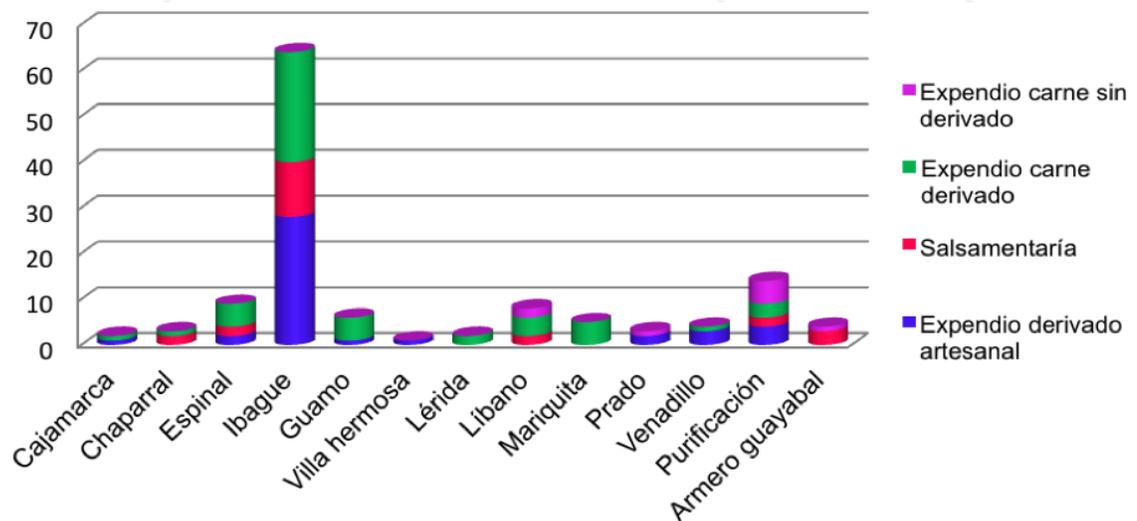


Figura 6. Tipos y número de establecimientos encontrados por municipio del departamento del Tolima

Productos

De acuerdo a los datos obtenidos, se encontró que los productos con mayor comercialización en su orden son: chorizo (34%), rellena (26%), longaniza (17%), salchichón (9%), jamón (7%), salchichas (7%) (Figura 7).

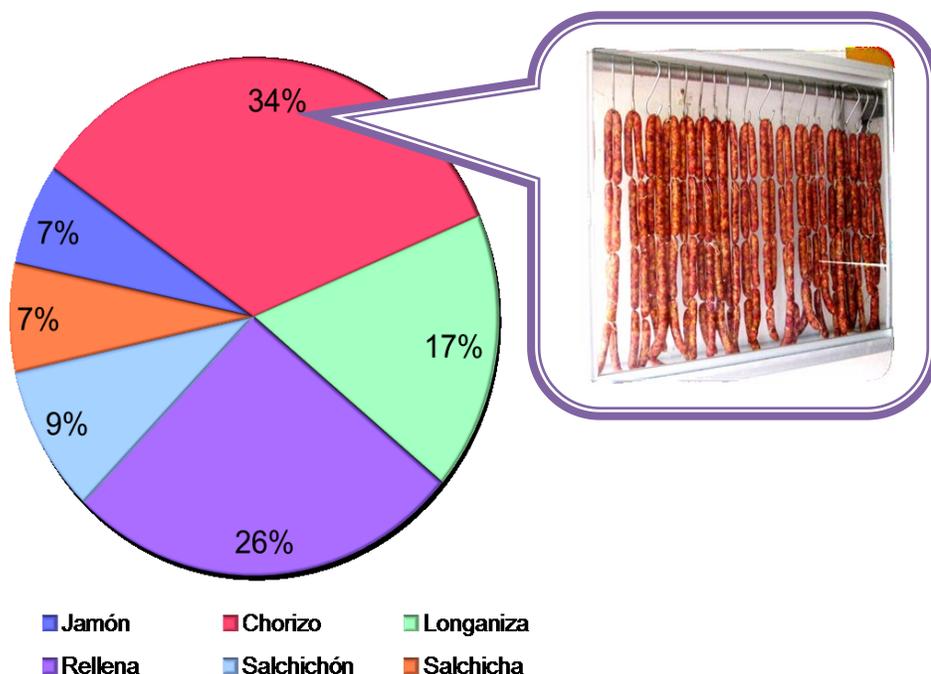


Figura 7. Derivados cárnicos de origen porcino comercializados en establecimientos del departamento del Tolima.

Limpieza y desinfección

De acuerdo con los resultados de la encuesta, se encontró que el 77% de los establecimientos realizan procesos de limpieza y desinfección en sus instalaciones, el 22 % no realizan este proceso y no se obtuvieron datos para el 1% restante (Figura 8). Solo el 3% de los encuestados tienen documentación de este prerrequisito. De las personas que dicen realizar procesos de desinfección, realmente solo el 46% de las industrias realizan una desinfección óptima. De estos el 42% usa como principal agente desinfectante el hipoclorito de sodio y el 4% emplea otro tipo de desinfectantes como ácido acético, ácido cítrico y amonios cuaternarios entre otros. El 54% realiza limpieza y desinfección ineficiente esto se debe a que parte de los encuestados asumen que los jabones y detergentes empleados por ellos tienen efecto desinfectante.

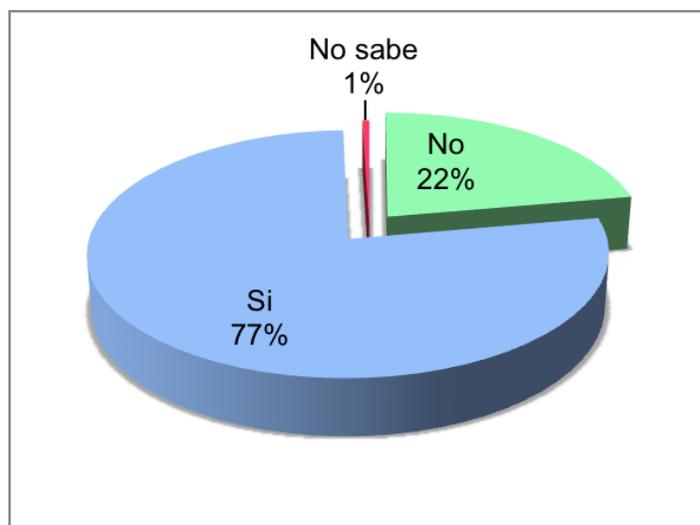


Figura 8. Porcentaje de realización de procesos de limpieza y desinfección en los establecimientos y fábricas de proceso de la cadena porcina del departamento del Tolima.

La situación actual se debe al desconocimiento de los protocolos de limpieza y desinfección por falta de capacitación del personal. Los manipuladores de alimentos no tienen clara la función de los detergentes ni de los desinfectantes en la limpieza de los lugares de trabajo. Situación que es aún más crítica en el caso de la comercialización informal.

En la figura 9 se muestran los diferentes sustancias empleadas en limpieza y desinfección empleados en los establecimientos encuestados. Las barras de color azul claro denotan las formas de desinfección asociados con el uso del hipoclorito. La barra morada corresponde a los otros tipos de desinfectantes como ácido acético, ácido cítrico y amonios cuaternarios, entre otros. Las barras azules oscuras agrupan los diferentes detergentes empleados durante la limpieza. La barra de color gris agrupa los establecimientos que no usan ningún tipo de agente limpiador ni desinfectante (Figura 9).

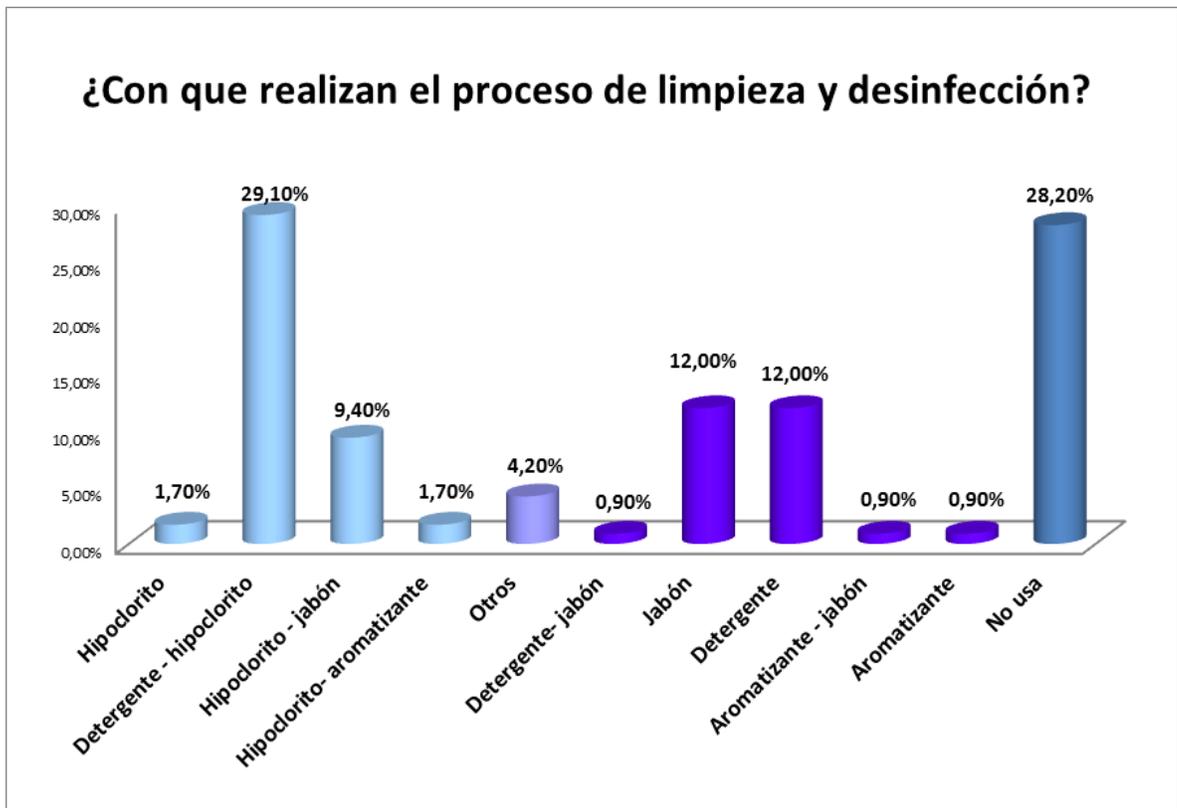


Figura 9. Tipo de sustancias empleadas en los establecimientos que realizan proceso de limpieza y desinfección.

En cuanto a los procesos de limpieza y desinfección diaria sólo el 52% de las personas encuestadas cumple con este requerimiento, el 39% realiza limpieza y desinfección semanal mente y el 29% no realiza con ninguna periodicidad este proceso lo que revela el incumplimiento a lo establecido en el artículo 29 del Capítulo 6 del decreto 3075 de 1997, el cual hace énfasis en que *“Cada establecimiento debe tener por escrito todos los procedimientos, incluyendo los agentes y sustancias utilizadas así como las concentraciones o formas de uso y los equipos e implementos requeridos para efectuar las operaciones, periodicidad de limpieza y desinfección”* (191). De los encuestados que dicen realizar los procesos de limpieza y desinfección el 90% no llevan registro escrito sobre el tipo

de procedimiento realizado, desinfectante empleado (recambio) y tiempo de contacto.

Cadena de frío

Al preguntar a los encuestados sobre el uso de cadena de frío en los procesos de almacenamiento de productos, el 60% dijo contar con sistemas de frío. Sin embargo, durante la encuesta se tomó la temperatura en cada uno de los sitios encuestados, donde se pudo comprobar que sólo el 8% cumple con lo establecido en el decreto 3075 (Temperatura 0-4°C) (Tabla 11) (Figura 10).

Se encontró que el 52% de los establecimientos comercializadores decían tener el alimento bajo condiciones de refrigeración pero al medir la temperatura esta estaba en un rango de 5-16 °C, demostrando que las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas durante la cadena de frío.

El 40% de los encuestados dijo no almacenar los alimentos en frío, lo que supone que los productos se encuentran expuestos a temperatura ambiente, como se mencionó previamente la mayoría de los municipios incluidos en el estudio se encuentran en climas cálidos, favoreciendo el desarrollo acelerado de los microorganismos, disminuyendo la vida útil de los productos comercializados.

El 92 % de los encuestados, incumple con el Artículo 19 de la resolución 4282, por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios y de inocuidad de la carne y productos cárnicos comestibles de la especie porcina destinada para el consumo humano y las disposiciones para su beneficio, desposte, almacenamiento, comercialización y expendio. El cual especifica que *“Los alimentos que por su naturaleza permiten un rápido crecimiento de microorganismos indeseables, particularmente los de mayor riesgo en salud*

pública deben mantenerse en condiciones que se evite su proliferación. Para el cumplimiento de este requisito deberán adoptarse medidas efectivas como:
- Mantener los alimentos a temperaturas de refrigeración no mayores de 4°C.”
(192).

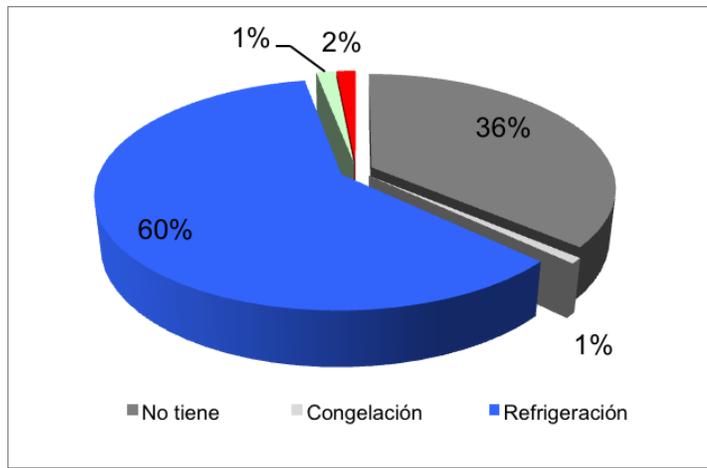


Figura 10. Tipos de equipos usados en la industria cárnica del departamento del Tolima.

Tabla 11. Relación entre la temperatura registrada en el refrigerador y el número de establecimientos evaluados (frecuencia).

T° Refrigeración (°C)	Frecuencia	Porcentaje*
2	1	1%
3	1	1%
4	7	6%
5	23	19%
6	16	13%
7	7	6%
8	15	12%
9	3	2%
10	6	5%
11	2	2%
12	10	8%
13	4	3%
14	17	14%
15	8	7%
16	4	3%

*Este porcentaje se toma de la totalidad de establecimientos a los cuales se les registró la temperatura.

Se observó que el 78% de los encuestados certifican capacitación en manipuladores, asumiendo que tienen conocimiento en Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), aspecto que no se ve reflejado en los programas de saneamiento descritos anteriormente.

Muestreo

Como se mencionó previamente, se realizaron 207 encuestas, sin embargo en el momento del muestreo solo se realizaron en 125 lugares, debido a: dificultad en obtener muestras en los establecimientos, cierre de algunos establecimientos por

parte del INVIMA o la Secretaria de Salud por fallas en higiene, cierres del negocio por parte del dueño. Cada lugar se muestreo una sola vez.

Se colectaron muestras de: rellena (53), chorizo (59), longaniza (47), salchicha (26), jamón (17), mortadela (1), salchichón (2), materia prima (26), utensilios (35), superficies (37), equipos (38) y otros (36) (Tabla 7).

Análisis microbiológicos

De las 377 muestras analizadas, se obtuvieron 62 aislamientos positivos para *Listeria monocytogenes*

PCR identificación género y especie

En la figura 11 se observan los aislamientos que por PCR dieron positivo para *L. monocytogenes*, donde solo 5 aislamientos correspondieron a esta especie (Figura 11) para un prevalencia de 1,3%; dos aislamientos correspondieron a *L. ivanovii* (0,5%) y las 55 cepas restantes correspondieron al género *Listeria* (para este trabajo no se identificaron las otras especies) (Tabla 12) .

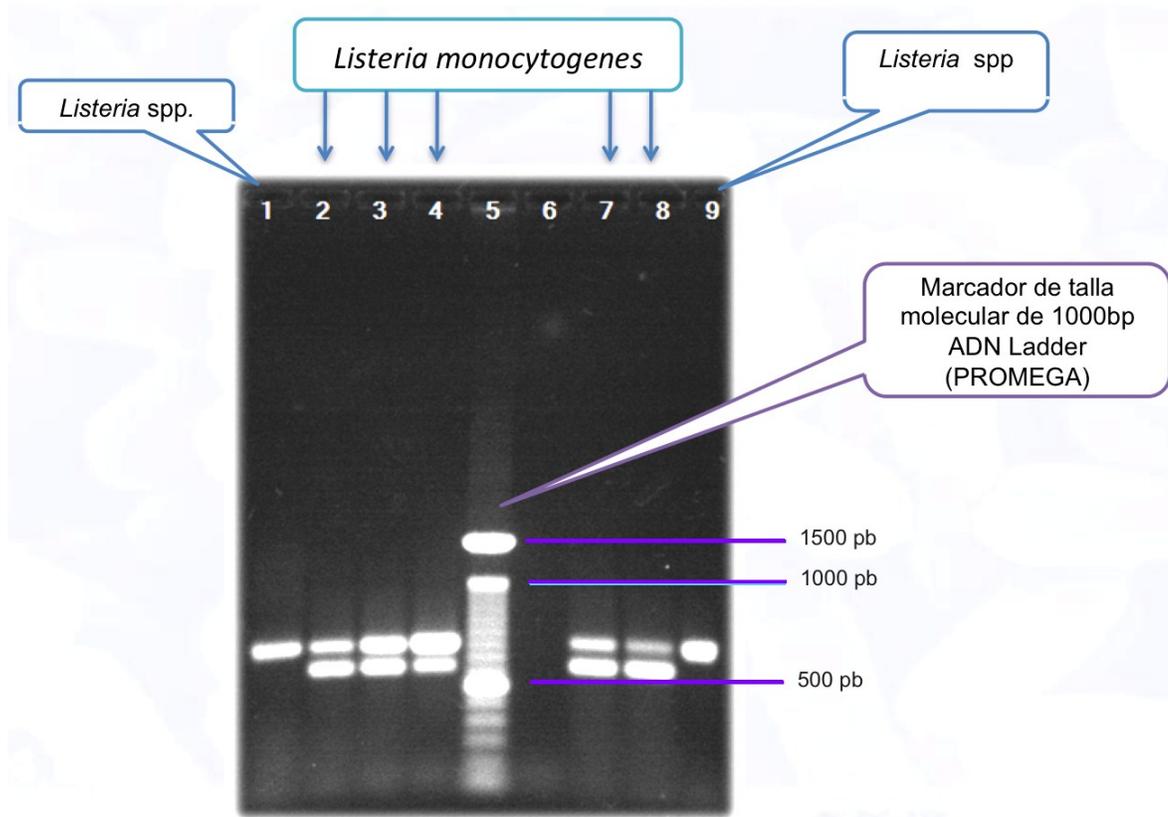


Figura 11. Gel de agarosa en electroforesis. Producto de PCR múltiple de género *Listeria* spp. (Banda sencilla de 750 pb) y especie *L. monocytogenes* (doble banda de 938 pb). Aislamientos de *Listeria* spp en carriles 1, 9; de *L. monocytogenes* en carriles 2, 3, 4, 7 y 8; en el carril 5 está el marcador de talla molecular de 1000 bp ADN Ladder (PROMEGA) y el carril 6 es el control negativo.

Tabla 12. Prevalencia de *L. monocytogenes*, *Listeria spp.*, y *L. ivanovii* en materia prima, derivados cárnicos, ambientes y otros, aislados en la cadena porcícola del departamento de Tolima.

Muestra	Número de muestras	Aislamiento de:					
		<i>Listeria spp</i>		<i>L. monocytogenes.</i>		<i>L. ivanovii</i>	
		Nº	(%)	Nº	(%)	Nº	(%)
Materia prima	26	8	(2,12)	2	(0,53)	-	-
Longaniza	47	19	(5,04)	-		-	-
Chorizo	59	8	(2,12)	-		1	(0,27)
Derivados cárnicos							
Jamón	17	2	(0,53)	-		-	-
Salchicha	26	1	(0,27)	-		-	-
Rellena	53	-	-	-		-	-
Mortadela	1	-	-	-		-	-
Ambientes							
Superficies	37	7	(1,86)	1	(0,27)	1	(0,27)
Equipos	38	5	(1,32)	-		-	-
Utensilios	35	4	(1,06)	1	(0,27)	-	-
Otros							
Manipuladores	36	1	(0,27)	1	(0,27)	-	-
Total	377	55	(14,6)	5	(1,34)	2	(0,53)

La prevalencia de *Listeria spp.*, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, se calculó sobre el total de muestras colectadas (377) en los establecimientos (expedios, salsamentarías y plantas de proceso) del departamento del Tolima (Tabla 13).

Del total de muestras presuntivas del género *Listeria* en este estudio, se aislaron en su la mayoría de expedios 43/62 (69,3 %), seguido de plantas de proceso 11/62 (17,7 %) y salsamentarias 8/62 (12,9 %) (Tabla 13).

Listeria spp., fue la única presente en salsamentarías con una prevalencia de 2,1 %; en expedios presentó valores de 10,1 %; y en plantas de proceso en un 2,4%. Por otra parte *L. monocytogenes* tuvo una prevalencia de 0,8 % en expedios y 0,53 % en plantas de proceso. Finalmente *L. ivanovii* solo se aisló de

expendios con una prevalencia de 0,53 % (Tabla 12, Tabla 13), provenientes del municipio del Líbano, zona donde hay uno número de granjas productoras de cerdo.

Tabla 13. Prevalencia de aislamientos de *Listeria* spp., *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, en establecimientos muestreados en el Departamento del Tolima.

	<i>Listeria</i> spp.		<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. ivanovii</i>	
	Aislamientos	(%)	Aislamientos	(%)	Aislamientos	(%)
Salsamentarias	8	(2,1)	-	-	-	-
Expendios	38	(10,1)	3	(0,8)	2	(0,53)
Plantas de proceso	9	(2,4)	2	(0,53)	-	-
Total (377)	55	(14,6)	5	(1,33)	2	(0,53)

Como se evidencia en el Anexo 3 (Tabla de resultados análisis moleculares) el tipo de producto que más aislamientos del género *Listeria* presentó fue la longaniza con 19 correspondiente al (30,6%), seguido de materia prima con 10 (16,1%), chorizo 9 (14,5 %), jamón 2 (3,2 %) y salchicha 1(1,6 %). En ambientes se aisló *Listeria* principalmente de superficies 9 (14.5%), equipos 5 (8,1 %), utensilios 5 (8,1 %) y manipulador 2 (3,2 %) (Tabla 14).

Los aislamientos de *L. monocytogenes* se obtuvieron en tres expendios y dos en plantas de proceso, de estos cuatro se aislaron en el municipio de Ibagué, se encontraron en utensilios, superficies y materias primas, el otro se aisló de un manipulador de alimentos en el municipio de Mariquita (Tabla 13).

Los aislamientos de *L. ivanovii* se obtuvieron en el municipio del Líbano en muestra de chorizo y superficie de no contacto (sifón), cabe resaltar que estos aislamientos se hallaron en un mismo expendio (Tabla 14).

Ibagué fue el municipio con mayor número de aislamientos del género *Listeria* con el 75,8 % (47), seguido de Mariquita 9,7 % (6), Líbano con 8,1 % (5), Lérica 4,8% (3) y el Espinal con el 1,6 %.

Tabla 14. Distribución de las especies del género *Listeria* aisladas de diferentes muestras de materia prima, derivados cárnicos, ambientes y otros en el departamento del Tolima.

Muestra	Aislamiento de:						Número de Aislamientos Nº (%)	
	<i>L. monocytogenes</i> Nº (%)		<i>Listeria</i> spp. Nº (%)		<i>L. ivanovii</i> Nº (%)			
Materia prima	2	(3,22)	8	(12,9)	-	-	10	(16,12)
Longaniza	-	-	19	(30,65)	-	-	19	(30,65)
Derivados cárnico	-	-	8	(12,9)	1	(1,61)	9	(14,52)
Jamón	-	-	2	(3,22)	-	-	2	(3,22)
Salchicha	-	-	1	(1,61)	-	-	1	(1,61)
Superficies	1	(1,61)	7	(11,29)	1	(1,61)	9	(14,52)
Ambientes	-	-	5	(8,06)	-	-	5	(8,06)
Utensilios	1	(1,61)	4	(6,45)	-	-	5	(8,06)
Otros	1	(1,61)	1	(1,61)	-	-	2	(3,22)
Total	5	(8,05)	55	(88,71)	2	(3,23)	62	(99,9)

Serotipificación de *L. monocytogenes*

Los serotipos de *L. monocytogenes* encontrados en expendios fueron 4b/4d/4e provenientes de un utensilio y de un manipulador de alimentos, el otro serotipo encontrado fue 4a/4c, aislado de superficie de trabajo. En planta de proceso se observaron los serotipos 4b/4d/4e aislados de materia prima (Tabla 15).

Tabla 15. Serotipos encontrados en los aislamientos de *L. monocytogenes*

Aislamiento	Serotipos	Muestra	Establecimiento	Origen
<i>L. monocytogenes</i>	4b/4d/4e	2	Expendio	Utensilio
<i>L. monocytogenes</i>	4b/4d/4e	7	Planta proceso	Materia prima
<i>L. monocytogenes</i>	4b/4d/4e	29	Planta proceso	Materia prima
<i>L. monocytogenes</i>	4b/4d/4e	37	Expendio	Manipulador
<i>L. monocytogenes</i>	4a/4c	42	Expendio	Superficie

Tolerancia a desinfectantes de *L. monocytogenes*

L. monocytogenes en su mayoría presentó tolerancia a los desinfectantes empleados (Alquil dimetil bencil cloruro de amonio y ácido peracético) en concentraciones y tiempos evaluados. Solo las muestras 29 y 42 fueron sensibles a concentración del 3% durante 15 minutos de contacto para el Alquil dimetil bencil cloruro de amonio (Tabla 16). Esto resultados fueron realizados dos veces.

Tabla 16. Resultados prueba tolerancia a desinfectantes

Aislamiento	Alquil dimetil bencil cloruro de amonio						Ácido peracético				
	0,50%		2,0 %		3,0%		0,50%		1,0%		
	5'	15'	5'	15'	5'	15'	5'	15'	5'	15'	
2	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
7	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
29	T	T	T	T	T	S	T	T	T	T	T
37	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
42	T	T	T	T	T	S	T	T	T	T	T

*T: Tolerante, S: Sensible.

Susceptibilidad antimicrobiana

Se evaluaron 62 aislamientos. Los aislamientos de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes* presentaron una susceptibilidad del 100% para Ampicilina, Penicilina, Trimetoprim/Sulfatometoxazol, Azitromicina, Clindamicina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Vancomicina (Tabla 17).

Tabla 17. Resultados prueba de susceptibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*.

ANTIMICROBIANO	PUNTOS DE CORTE (Mg/MI)			AISLAMIENTOS DE <i>Listeria</i> SPP. % (#)			AISLAMIENTOS DE <i>Listeria monocytogenes</i> % (#)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S
Ampicilina	-	-	≤2	-	-	100(57)	-	-	100(5)
Penicilina	-	-	≤2	-	-	100(57)	-	-	100(5)
Trimetoprim / sulfatometoxazol	≥4/76	1-2	≤0,5/9,5	-	-	100(57)	-	-	100(5)
Azitromicina	≥8	4	≤2	-	-	100(57)	-	-	100(5)
Clindamicina	≥4	1-2	≤0,5	-	-	100(57)	-	-	100(5)
Cloranfenicol	≥32	16	≤8	-	-	100(57)	-	-	100(5)
Tetraciclina	≥16	8	≤4	-	-	100(57)	-	-	100(5)
Vancomicina	≥16	4-8	≤2	-	-	100(57)	-	-	100(5)
Amoxicilina	≥32	4	≤8	-	-	100(57)	-	20(1)	80(4)
Meropenen	≥16	8	≤4	-	-	100(57)	-	80(4)	20(1)
Rifampicina	≥4	2	≤1	-	2(1)	98(56)	-	-	100(5)
Eritromicina	≥8	1-4	≤0,5	-	4(2)	96(55)	-	-	100(5)
Ciprofloxacina	≥4	2	≤1	-	30(17)	70(40)	-	-	100(5)

Las MIC fueron tomadas de (104)

En la segunda columna se referencian los puntos de corte de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC), empleadas para la lectura de los paneles (MicroScan system) por cada antibiótico. Nótese (-) el cual indica la no existencia de dato. R: resistente, I: intermedio, S: susceptible.

Control y prevención de *L. monocytogenes*

Inicialmente se realizó un curso de sensibilización a dueños y operarios de la industria de alimentos del Tolima, enfocado específicamente en el conocimiento de *L. monocytogenes* y sus efectos en la industria, también se incluyeron aspectos fundamentales en el control de estos microorganismos, basados en el programa de limpieza y desinfección.

La recomendación es diseñar estrategias para el control de *L. monocytogenes* en plantas procesadoras de derivados cárnicos es:

Higiene: Hay que vigilar la calidad de las materias primas e insumos para evitar la contaminación cruzada durante la producción de derivados cárnicos de origen porcino.

Agua: El agua potable es un requisito indispensable el cual debe ser controlado y monitoreado.

Capacitación: Los operarios deben llevar a cabo las estrategias de control de *L. monocytogenes* y de otros microorganismos, aplicando Buenas Prácticas de Manufactura y Procedimientos de Operación Estándar de Saneamiento.

Fabricación: Durante este proceso es importante controlar la temperatura, humedad relativa y el pH.

Áreas de elaboración: Las instalaciones deben estar separadas las zonas de manipulación de materia prima y producto final con el fin de evitar la diseminación de *L. monocytogenes* en planta.

Limpieza y desinfección: la aplicación de estos programas con una rotación de desinfectantes evita la presencia de *L. monocytogenes*.

En cumplimiento de estas estrategias se publicaron 1000 ejemplares de la cartilla “Control de *Listeria monocytogenes*, de la planta de proceso a la mesa”, su contenido incluye los siguientes temas:

- Descripción de la cadena porcina en el Tolima .

- Enfermedades transmitidas por alimentos ETA, definición, clasificación y ETA asociadas al consumo de derivados cárnicos porcinos.
- *L. monocytogenes* generalidades, ingreso a cadena alimenticia, ciclo y factores de virulencia.
- Control de ETA.
 - Normativa
 - Programas de control
- Plan estratégico de control
 - Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento.
 - Programa de Limpieza y desinfección.

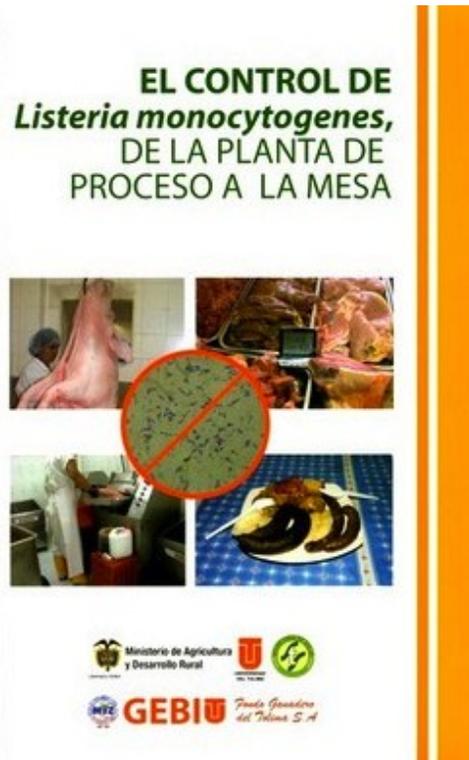


Figura 12. Portada Cartilla.

La socialización se realizó en el marco del I seminario de Salmonella y Listeria en la cadena porcina, evento desarrollado en la Universidad del Tolima el 10 de mayo de 2011, al cual asistieron aproximadamente 500 personas, entre ellas productores, fabricantes, comercializadores del departamento y comunidad universitaria. En este seminario se mostraron los resultados de los proyectos incluyendo los preliminares de éste estudio (Figura 13). Donde se habló del riesgo de contaminación y control de *L. monocytogenes* en la cadena porcícola del departamento del Tolima, en la que también se entregaron las cartillas educativas mencionadas anteriormente.



Figura 13. Registro fotográfico, I Seminario Nacional de *Salmonella* y *Listeria* en la cadena porcina de Tolima.

DISCUSIÓN

De acuerdo a las directrices del CONPES-3458 del 2007, tendientes a solucionar problemas relacionados entre otros con la inocuidad y las condiciones sanitarias de las plantas de proceso de carne y sus derivados (30), se realizó este trabajo con el fin de conocer, mantener y/o mejorar las condiciones sanitarias en eslabones tales como producción y comercialización de la cadena porcina, para lograr la admisibilidad en los mercados de interés, el fortalecimiento de la salud pública y el mejoramiento de la competitividad de las cadenas (192) en el departamento del Tolima.

Es por lo anterior que en la fase inicial se realizó el diagnóstico de la condición higiénica sanitaria, volumen de producción y comercialización de los derivados cárnicos de origen porcino en el departamento del Tolima, con la aplicación de la encuesta en plantas de proceso y en establecimientos que comercializan derivados cárnicos. Como resultado de las encuestas realizadas se encontró que en estos establecimientos se comercializaron mensualmente 1.868 canales de cerdo. Al relacionar este dato con las 1056 cabezas que registraron las plantas de beneficio, para el mismo período, se evidencia una diferencia que corresponde al beneficio ilegal y/o el ingreso de cerdos beneficiados de otras regiones, que representa el 46% de este comercio.

El significativo volumen de carne de origen porcino que se comercializa sin cumplir los estándares higiénicos sanitarios establecidos en la resolución 4282 de 2007, que reglamenta el decreto 1500, atenta contra la salud humana, afectando a los porcicultores por la competencia desleal y generando un riesgo

para el consumidor. En cumplimiento de la ley 9ª de 1979 y el decreto 2278 de 1982, el sacrificio de porcinos debe realizarse en un beneficiadero que cumpla los requisitos higiénicos sanitarios exigidos por la ley. Con el decreto 1828 de junio 9 del 2006 el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, creó la comisión nacional intersectorial para la coordinación y orientación del sacrificio de porcinos. La cual se encarga en apoyar, evaluar y promover la normativa en inspección, vigilancia y control del sacrificio porcino de territorio nacional (192, 193), este trabajo estableció que a pesar de existir una serie de reglamentaciones para la vigilancia en el beneficio, procesamiento y comercialización de carne porcina y sus derivados, existe una falta de conocimiento por parte de los procesadores, así como una falta de vigilancia por parte de los entes gubernamentales encargados de la vigilancia, aspecto que afecta la inocuidad de estos productos .

La evaluación de la presencia *L. monocytogenes* a partir de muestras de materia prima, derivados cárnicos, ambientes, superficies y de manipuladores en la industria alimentaria, en especial la cadena de producción porcina, constituye una necesidad de primer orden que debe ser resuelta para evaluar el grado y origen de contaminación relacionada con las condiciones higiénico sanitarias de plantas y expendios que permiten su diseminación. Esta evaluación se convierte en un aporte de relevante importancia en la industria de alimentos y a nivel de salud pública, pues el conocimiento de la dinámica de esta bacteria en la industria cárnica, permite generar planes estratégicos para su control y reducción de tal manera que se pueda garantizar la inocuidad del derivado cárnico de origen porcino (26, 27).

En éste sentido, el estudio molecular mostró ser una herramienta apropiada para la confirmación de la presencia de *L. monocytogenes* en los aislamientos

obtenidos por métodos convencionales, en derivados cárnicos porcinos (longaniza, chorizo, rellena, jamón, salchicha y salchichón), ambientes y manipuladores. El estudio molecular también permitió discriminar los otros aislamientos como *L. ivanovii* y *Listeria* spp., que de acuerdo a los resultados preliminares por métodos convencionales se habían identificado como *L. monocytogenes* (39, 45, 55, 94), con mayor frecuencia se observa en la literatura que el método microbiológico no presenta la discriminación para diferenciar entre las especies de este género, como las pruebas bioquímicas no pueden distinguir claramente entre *L. monocytogenes* y *L. innocua*, como por ejemplo en cepas con una hemólisis débil. Caso contrario con las pruebas moleculares, ya que tienen una alta especificidad otorgada por los primers empleados que pueden ser cercanos al 100%, de ahí la importancia de realizar una confirmación por estas técnicas (178).

En cuanto a la confirmación de los aislamiento presuntivos por métodos convencionales de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* y *Listeria* spp, Poutou y colaboradores 2005, postulan que la PCR tiene ventaja sobre el método convencional porque permite obtener resultados en menor tiempo, y además porque la PCR se basa en diferencias dentro del genoma y no en la expresión de ciertos factores antigénicos o enzimas que son menos estables y que pueden ser causa de las inconformidades encontradas en la respuestas de *Listeria* frente a las pruebas bioquímicas clásicas (178).

De otro lado, teniendo en cuenta que para el aislamiento e identificación de *Listeria* a partir de un alimento por el método convencional se requiere un periodo de 5 a 10 días si se desea diferenciar *Listeria* spp. de *L. monocytogenes*, Torres y colaboradores 2005, afirman que el método molecular es una herramienta que brinda múltiples ventajas entre las cuales está la de poder realizar un diagnóstico

en menor tiempo (29 horas y 40 minutos) (8), facilita el análisis de un número mayor de muestras para monitorear todas las etapas del proceso de producción, evita la presunción de resultados falsos positivos o negativos que pueden presentarse por diferentes factores en el método convencional.

Torres y colaboradores 2004, realizaron la validación de la PCR para la detección de *L. monocytogenes* y concluyeron que esta técnica es altamente específica y sensible en la medida que permitió determinar el género y la especie obteniendo productos de amplificación de 938 pb y 750 pb con los juegos de primer LI1-U1 y LF-LR, respectivamente, confirmando la viabilidad de este protocolo en el control de calidad de carnes cruda de res y de pollo (194).

Otra aplicación de las técnicas moleculares que ha sido bien estudiada en los últimos años por Zhang y colaboradores 2004 y Doumith y colaboradores 2004, donde las herramientas filogenéticas basadas en el análisis comparativo del DNAr 16S y 23S, *iap*, *prs*, *vcIB* y *ldh* entre otros, permiten inferir la evolución de las serovariedades y los diferentes linajes de *L. monocytogenes* (195, 14). Otra importancia del estudio molecular es permitir discriminar *L. monocytogenes* de las otras especies que pertenecen al género *Listeria* como lo proponen Buchrieser y colaboradores 2011, Kovacevi y colaboradores 2012 y Murphy y colaboradores 2007 (196, 197, 198).

Es así como en este estudio se evidenció la prevalencia para *L. monocytogenes* en materia prima del 8% (2/26), seguido por utensilios (1/35) y superficies (1/37) con el 3% cada uno, finalmente en muestras de heces de manipulador de alimentos (1/36) 3%, para un total (5/377), correspondiente al 1.3% del total de las muestras analizadas. Este valor es bajo al comparar estos resultados con los

reportados por Vera y colaboradores 2006, en el estudio realizado por la Secretaría de Salud de Bogotá donde encontraron la prevalencia de 11.2 % en diferentes derivados cárnicos procesados para el consumo en los tres años del estudio (2001 al 2004), en 1611 muestras analizadas (27). Los datos obtenidos siguen siendo bajos comparado con los resultados de Gamboa y colaboradores 2012, donde la prevalencia de *L. monocytogenes* en carne fresca de 46,2%, en salchicha de 8,7%, en jamón de 6,5%, y en chorizo de 5,5% (28), las razones que pueden estar asociada a esta baja prevalencia incluyen: la mayoría de productos analizados si bien era derivados cárnicos, eran crudos donde las cargas microbianas acompañantes podían haber inhibido la presencia de este patógeno, la mayoría de los productos estaban por fuera de refrigeración lo que favorece el crecimiento de estos microorganismos, un posible exceso de nitritos que puede inhibir a listeria asociado a fallas en los procesos de estandarización de formulación.

De los productos contaminados con *L. monocytogenes*, dos eran de materia prima, donde se puede deducir que el proveedor de producto cárnico porcino está realizando de manera inadecuada el desposte (rompiendo tonsilas o viseras), contaminando materia prima desde la canal. A nivel de planta de beneficio, las fuentes potenciales de *Listeria* pueden ser los utensilios empleados para el sacrificio, izamiento y degüello contaminados por operaciones anteriores o mal desinfectados, como también lo son las manos y ropas de los operarios, equipos y superficies de contacto con la carne. Otro factor es la ubicuidad del microorganismo. Si llega la materia prima contaminada fácilmente se puede diseminar por la planta al estar en contacto con mesones, cuchillos y otros utensilios, durante el proceso de elaboración hasta fase de producto terminado, por contaminación cruzada.

El ingreso de materia prima contaminada con *L. monocytogenes* afecta a la industria cárnica, convirtiendo la carne de cerdo en un factor de riesgo al ser uno de los principales vehículos de este microorganismo en planta de proceso. Thevenot y colaboradores 2005, Wagner 2012, Gibbons y colaboradores 2006 y Chasseignaux y colaboradores 2002, establecen que *L. monocytogenes* puede diseminarse en el ambiente y en equipos, favoreciendo la contaminación cruzada y aumentando las posibilidades de recontaminación durante el proceso de elaboración y empaclado (16, 120, 145, 199).

La presencia de *L. monocytogenes* en derivados cárnicos puede darse por contaminación post proceso llevando a que alimentos como los listos para el consumo (LPC) proporcionen en ambiente adecuado para la multiplicación de esta bacteria. La contaminación post proceso puede darse por el contacto directo con cuchillos, mesones y otras superficies como tajadoras. Otra habilidad que desarrolla *L. monocytogenes* es la capacidad de formar biopelículas en superficies como acero inoxidable, vidrio y plásticos como lo reportaron Samelis & Metaxopoulos 1999, Rivera y colaboradores 2006 y Vanegas y colaboradores 2009 (156, 47, 106).

Chasseignaux y colaboradores 2002, Tompkin 2002, Thevenot y colaboradores 2005 y Meloni y colaboradores 2009 entre otros, señalan que la presencia de *L. monocytogenes* en productos cárnicos está asociada a la contaminación cruzada con carnes crudas, equipos y áreas de procesamiento, áreas de refrigeración, áreas de empaque y/o personal de establecimiento (199, 200, 16, 96).

En este estudio se encontró *L. monocytogenes* en utensilios y superficies. Norwood & Gilmour 2001, Carpenter & Chassaing 2004 y Rieu y colaboradores 2008 reportan la presencia de esta bacteria puede estar asociada a la ausencia

y/o deficiencia en los procesos de limpieza y desinfección, lo que puede favorecer que este microorganismo pueda formar nichos por periodos prolongados de tiempo (130, 131, 134). Carpenter & Chassaing 2004 observaron que la formación de biopelículas puede brindar protección frente a los desinfectantes utilizados en la industria de alimentos, como pudo observarse en este estudio las cepas analizadas resultaron tolerantes a los agentes evaluados (131). Pan y colaboradores 2012 reportan a los cuchillos como causante de la contaminación en alimentos durante el corte, poniendo en duda la eficiencia de los procesos de higiene y desinfección en utensilios y superficies de trabajo (52).

La temperatura, las condiciones ambientales y el tiempo de almacenamiento inciden directamente en el crecimiento y multiplicación de *L. monocytogenes* si el alimento está previamente contaminado. En los tres municipios del departamento del Tolima donde se obtuvieron los cinco aislados de este patógeno la temperatura de almacenamiento de los productos favorecía el crecimiento de *L. monocytogenes* (63). El municipio de Ibagué está a 1.225 msnm, con una temperatura promedio de 24°C y una humedad relativa de 84%, Mariquita tiene una altura de 495 msnm, con 27°C de temperatura y 70% de humedad y el municipio del Líbano está a 1565 msnm, con una humedad relativa de 74 y temperatura promedio de 20°. Una característica común a los tres municipios es la humedad relativa superior al 70%, que unido a malos hábitos de higiene en los establecimientos, dan lugar al crecimiento de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*. Existen reportes donde la presencia del microorganismo está dada en zonas de trabajo a una humedad relativa de 70-80%, con pH de 6 – 6,5 (16). El alto contenido de humedad en el ambiente favorece la formación de biopelículas, otros aspectos en las instalaciones que también influyen incluyen los depósitos de agua, pisos, drenajes y cuartos fríos (dependiendo al establecimiento).

Al ser *L. monocytogenes* psicrótrofo, tiene la capacidad de crecer a temperaturas de refrigeración, pero al encontrarse a temperatura ambiente reduce sus posibilidades de sobrevivir al tener competidores con ventajas metabólicas sobre él. Pan y colaboradores 2010, Xie y colaboradores 2012 y Norwood & Gilmour 2001 evidencian que el mecanismo para subsistir es la unión con otros microorganismos como *Pseudomonas* spp., la cual tienen altas tasas de multiplicación, permitiéndole formar nichos ecológicos resistentes al ataque de otros microorganismos y a la acción de desinfectantes (52, 65, 130).

Al relacionar la presencia de *L. monocytogenes* con las temperaturas de almacenamiento se observó que la presencia de ésta se dió cuando las temperaturas estaban por debajo de 8°C. Sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre la temperatura y la presencia del género *Listeria* spp (p: 0.1362), fenómeno que puede estar relacionado con que las otras especies no son psicrótrofas.

Como se dijo anteriormente, la comercialización y consumo de derivados cárnicos porcinos en el departamento del Tolima están representados en las comidas típicas de fabricación artesanal como: chorizo, rellena y longaniza, productos que no entran en los criterios de LPC, los alimentos listos para el consumo tienen las siguientes características que favorecen el desarrollo de *L. monocytogenes*: 1) haber sido sometidos a un proceso térmico industrial, 2) almacenarse en condiciones de refrigeración 3) tener una larga vida útil y 4) no someterse a un proceso de cocción por parte del consumidor. Es posible que aunque exista *L. monocytogenes* en la muestra junto a flora acompañante con mayor crecimiento al de este patógeno pueda inhibirlo y en consecuencia no ser detectable por los métodos convencionales de este estudio.

El chorizo es un producto derivado de carne porcina, preparado a base de carne y grasa con adición de sustancias de uso permitido como aliños, según la Norma Técnica Colombiana 1325 donde puede ser cocido, crudo y precocido, fermentado o no. Molina y colaboradores 2009, reportan que con 15 minutos de cocción y 5 minutos de fritura de este alimento se da la inactivación de *L. monocytogenes* (61). Vera y colaboradores 2006, detectaron una prevalencia de 18,1% de *L. monocytogenes* en chorizo al encontrar 2 muestras positivas de 11 evaluadas (27) y Gamboa y colaboradores 2012, encontraron una prevalencia *L. monocytogenes* del 5,5% en chorizo crudo, en el presente estudio la prevalencia de este microorganismo fue de 0%, al respecto se puede inferir que los datos no pueden compararse ya que el número de muestras de chorizos analizadas es relativamente bajo (59) si se compara los muestreados por Gamboa (109), de otro lado si se mira los el tipo de producción, los chorizos analizados por Gamboa y colaboradores eran industriales a diferencia de los obtenidos en este estudio los cuales provenían de procesos artesanales, donde el chorizo era crudo y puede dar lugar a mayor contaminación con flora acompañante altamente competitiva que puede inhibir a *L. monocytogenes*, como ya se había comentado anteriormente.

La rellena es uno de los productos que más se comercializa y consume en el departamento, ocupando el 26% del mercado local. En este producto tampoco se logró el aislamiento de *L. monocytogenes* lo que podría explicarse por el proceso térmico al que es sometido durante su fabricación.

La longaniza es un producto cárnico procesado crudo clasificado como embutido no madurado y sin adición de conservantes, lo que incrementa el riesgo de

presencia de patógenos, incluida *L. monocytogenes*. En este caso si bien no se aisló *L. monocytogenes*, es importante tener en cuenta que la prevalencia de *Listeria* spp. fue del 40% al aislarse en 19 de 47 muestras analizadas de este producto. Esto es un indicador de fallas en la aplicación de los protocolos de higiene y desinfección, datos que se corroboran con las encuestas. De Curtis y colaboradores 2002, afirman que la presencia de cualquier especie de *Listeria* se debe considerar como indicador de higiene deficiente, porque su presencia representa riesgo de contaminación con otros patógenos entre los que se encuentra *L. monocytogenes* (145, 149, 156, 203).

Existen estudios de alimentos similares al presente, como el de Martino y colaboradores 2005, que hallaron *L. monocytogenes* en embutidos y ahumados en 2%, y también aislaron *L. innocua*, *L. welshimeri* y *Listeria* spp., en el 4,1%, 1,0% y 3,1% respectivamente en las muestras analizadas (204). Dado que las condiciones de elaboración y costumbres locales varían, reportan una menor proporción de *Listeria* spp (3.1%), mientras que este microorganismo en el presente estudio, alcanzó un promedio de 27.4% entre longaniza y chorizo.

Un estudio realizado para Asoporcicultores por Velazco 2008, describe los expendios o famas tradicionales como establecimientos pequeños y medianos de tipo familiar, que venden carne al consumidor y se localizan en barrios y plazas de mercado (29). En general tienen una infraestructura deficiente, reflejándose en problemas de calidad. Caso contrario al de famas y grandes superficies, donde la especialidad es la venta de cortes finos de carne, empleando tecnología en el proceso, almacenamiento y transporte. Esta descripción se cumple fielmente con lo encontrado durante la encuesta realizada en este estudio. Las cadenas de grandes superficies se especializan en el expendio de carnes finas con adecuadas condiciones higiénicas, lo que les permite ofrecer una amplia gama

de productos al consumidor, los cuales solo se reciben si vienen empaquetados de manera adecuada y se conservan a temperaturas adecuadas (29), contrario a lo observado en los expendios de plazas de mercado y algunas salsamentarias encuestadas del departamento del Tolima.

Los consumidores del departamento del Tolima se caracterizan por usar la red tradicional de comercialización donde los productos alimenticios se compran en su mayoría en plazas de mercado. Predominando el consumo de comidas propias del departamento las cuales se venden de modo informal en pequeños expendios ubicados en plazas, tiendas de barrio o mini mercados, entre otros. En estos expendios no existe garantía en aspectos tan importantes como la implementación de programas de saneamiento y el almacenamiento en neveras panorámicas a temperaturas de adecuadas durante la comercialización. Una de las medidas de control más ampliamente utilizadas en la industria de alimentos para la reducción de *L. monocytogenes* es la implementación de programas de limpieza y desinfección. Como se mencionó previamente la encuesta determinó la falta de conocimiento en la aplicación de este programa en los establecimientos encuestados, lo que favorece la presencia, colonización, diseminación y persistencia de este microorganismo pues una vez ha colonizado los establecimientos es más difícil su eliminación. En este estudio estas fallas en los programas de higiene y desinfección pudieron demostrarse al encontrar porcentajes altos de *Listeria* spp en las muestras ambientales.

Las serovariedades 1/2a, 1/2b y 1/2c son frecuentemente aisladas a partir de varios tipos de alimentos y ambientes de procesamiento (16). En la investigación realizada por Chasseignaux y colaboradores 2001, se aisló principalmente la serovariedad 1/2a con una prevalencia de 64,0%, seguida de 1/2b (14,0%), 4a (7,5%), 1/2c (4,0%), 3b (2,0%), 3a (1,5%) y 4ab (1,0%), a partir de dos plantas de

procesamiento en las cuales se muestrearon superficies, equipos, carne y productos cárnicos de cerdo y pollo (127).

El estudio de las serovariedades de los aislamientos de *L. monocytogenes* en ambientes, alimentos y en humanos ha servido para identificar las vías de transmisión de la infección, y así poder controlar la cadena alimentaria. Pan y colaboradores 2010 y Nadon y colaboradores 2001, postulan que el serotipo más frecuente en aislamientos de origen humano es 4b (52, 77). En este estudio el serotipo encontrado fue 4b/4d/4e y 4a/4c, aislado de manipuladores, utensilios y materia prima.

Gamboa y colaboradores 2012, encontraron una elevada prevalencia de la serovariedad 1/2a/3a en carne fresca, mientras que en canales porcinas predominó la serovariedad 4b/4d/4e. Los Gamboa-Marin y colaboradores 2012, sugieren que estas serovariedades están más adaptadas al ambiente de la planta de proceso (28). Otros estudios de Korkeala & Siitonen 2003 y Comi y colaboradores 1992, evidencian que las cepas del grupo antigénico 1/2 presenta mayor prevalencia en alimentos que las del grupo 4 (13, 160), Pan y colaboradores 2010, Nadon y colaboradores 2001 y Borucky & Call 2003, confirman el serotipo 4b como el más aislado en pacientes con listeriosis (52, 77, 94).

Ruiz y colaboradores 2006 y Grinstead 2009, afirman que una limpieza continua y rotativa evita que el microorganismo genere resistencia a los desinfectantes y la formación de biopelículas (36, 70). De acuerdo con lo anterior Grinstead 2009, destaca la importancia de los Procesos Operativos Estándar de Saneamiento

(POES), éste facilita llevar el registro de operaciones efectuadas en las instalaciones durante todos los procesos (70).

Para contribuir a la inocuidad de los alimentos hay que establecer protocolos de limpieza de expendios, plantas y salsamentarías. Es indispensable que las empresas tengan procesos bien definidos y adecuados para cada una de las áreas ya sea expendio o planta de proceso, incluyendo infraestructura locativa como mesones, drenajes y áreas encharcadas, equipos y utensilios con un monitoreo continuo de *Listeria* spp., ya que al estar presente este microorganismo lo más probable es que *L. monocytogenes* esté presente (36).

De esta manera, se deben implementar los POES que facilitan el registro de las actividades que se efectúen antes, durante y/o después del trabajo en las instalaciones, los equipos o utensilios. También, se debe contar con el formato de registro y control previamente establecido por la planta procesadora para vigilar las actividades del programa de limpieza y desinfección. Cualquier incidencia o desviación a lo previsto implicará la implementación de un formato de acciones correctivas y la adopción de las mismas (120).

Entre los desinfectantes ensayados en el presente estudio se encuentra el Alquil dimetil bencil amonio, es un desinfectante a base de amonios cuaternarios usado en la industria alimentaria. Es un biocida para el control de bacterias en locales, refrigeradores y almacenes, que diluido en agua se puede aplicar por pulverización para desinfectar ambientes y superficies (36, 69, 187). El cual tuvo efecto en dos de los cinco aislamientos analizados a una alta concentración (2%) y durante un prolongado tiempo (15 minutos).

Otro desinfectante utilizado es ácido peracético un agente oxidante que actúa como biocida sobre el cuerpo vegetativo de las bacterias, moho, levaduras y parte de virus. Su actividad depende del PH=9, donde la acción de los grupos sulfidrilos actúan en proteínas y enzimas que por oxidación rompen la membrana plasmática (205). Rodgers y colaboradores 2004, determinaron la eficiencia *in vitro* de ácido peracético (80ppm) sobre *L. monocytogenes*, la cual fue efectivo en 75 seg. Afectando la función quimiosmótica de la membrana citoplasmática de la lipoproteína, así como la función de transporte de nutrientes de los microorganismos a través de la ruptura de la pared celular (23, 65, 206). No obstante Stoporth y colaboradores 2002, demostraron la transferencia de información para la tolerancia a desinfectantes generada por la asociación de biopelículas (207).

Se realizaron las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana a los cinco aislamientos confirmados de *L. monocytogenes*, donde se halló que los aislamientos de *L. monocytogenes* presentaron susceptibilidad a antibióticos como: Penicilina, Ampicilina, Cloranfenicol, Trimetropin/Sulfatometoxazol, Rifampicina, Amoxicilina, Clindamicina, Tetraciclina, Azitromicina, Eritromicina, Vancomicina, Ciprofloxacina. Datos similares a Haraek y colaboradores 2009, quienes reportan una susceptibilidad a ampicilina del 60% (115). Srinivasan y colaboradores 2005, detectaron la resistencia a penicilina del 92% (201). Schôbitz y colaboradores 2009 Reportan que el 100% de aislamientos son resistentes a ácido nalidíxico (9). Así mismo, Santos y colaboradores 2002, encontraron resistencia a ampicilina del 100%, penicilina 66,7%, ciprofloxacina 83,4%, cloranfenicol 66,7%. Trimetropin/Sulfatometoxazol fue el antibiótico al que el 100% de los aislamientos fueron sensibles (202), siendo el antibiótico más eficaz, dato similar al de Michelet y colaboradores 19997 (103) que fue del 83,3%. En el presente estudio se identificó aislamientos de *Listeria* spp. y *L. monocytogenes*, presentaron una susceptibilidad del 100% para Ampicilina,

Penicilina, Trimetoprim/ Sulfatometoxazol, Azitromicina, Clindamicina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Vancomicina y una resistencia del 100% a Cefotaxime, Cefepime y Cefaclor (Tabla 15).

Los programas de muestreo o monitoreo deben hacerse por proceso, eligiendo puntos críticos para evitar posteriores contaminaciones en los alimentos, este tipo de actividades deben ser progresivas, ya que gran parte de la industria del departamento no está siendo actualmente monitoreada, lo importante es empezar a cambiar los hábitos de elaboración de derivados cárnicos donde se implementen procesos de limpieza y desinfección efectivos, proyectándose a futuro poder cumplir con lo establecido por FDA/FSIS donde se realizan análisis microbiológicos, se monitorean ambientes y superficies de contacto con los alimentos para asegurar y validar la sanitización de los equipos y áreas de proceso controlando efectivamente la presencia de *L. monocytogenes*.

El presente estudio pone en evidencia la circulación de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, en la cadena productiva porcícola del Departamento del Tolima. Demostrando que las políticas de salud pública del departamento del Tolima no han incluido dentro de su vigilancia de manera continua a este microorganismo, una de las dificultades puede ser necesario la falta de casos en humanos reportados en el sistema de vigilancia, por lo que se considera que no está presente la enfermedad, sin embargo esto no es del todo cierto ya que puede deberse a un sub-registro de los casos, de otro lado otro factor que puede influir es que al comparar la industria cárnica de este departamento con otras zonas del país el bajo nivel de tecnificación y la baja producción hacen que los muestreos por parte del laboratorio de salud pública sean bajos, si se comparan con otros renglones agrícolas del departamento, a pesar de esto es necesario tomar medidas de control en toda la cadena productiva cárnica porcina (plantas de

proceso y expendios), ya que gran parte de la población del departamento puede estar expuesto a listeriosis causado por *L. monocytogenes*; siendo de especial interés los grupos de riesgo, lo cual puede generar una alta tasa de hospitalización resultando en altos costos económicos y lo más importante pérdidas humanas.

Este es el primer estudio de las condiciones del departamento del Tolima en cuanto a la presencia de patógenos e higiene en la industria de alimentos cárnicos del Tolima, siendo el primer panorama de *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* mostrando la necesidad de la implementación de medidas de control en la industria cárnica porcina.

CONCLUSIONES

En este estudio se detectó una prevalencia de *L. monocytogenes* del 1,3 % (cinco aislamientos) total de muestras analizadas 377, de los cinco aislamientos se recuperaron dos muestras de materia prima de carne de cerdo, corresponden al 8%, uno aislada de utensilios uno de superficie y uno de manipulador de alimentos correspondiendo al 3 % confirmando la presencia de este patógeno en la planta de proceso y en expendios de derivados cárnicos, lo que genera un riesgo de contaminación para el producto terminado y por ende para consumidor que forme parte del grupo de riesgo

En la serotipificación de *L. monocytogenes* el serotipo más frecuente fue el 4b/4d/4e encontrado en dos muestras de materia prima de dos plantas de proceso diferentes, una de utensilio en expendio y una de heces de un manipulador de alimentos de expendio. También se encontró serotipo 4a/4c proveniente de una muestra de superficie en expendio, lo que indica que existen deficiencias en el control de *L. monocytogenes* en el manejo de la canal y/o durante el proceso de transformación de la carne de cerdo en la fábrica, lo cual puede estar asociados a manipulación inadecuada o fallas en procesos de limpieza y desinfección de equipos y utensilios.

En este estudio también se confirmó la presencia de *L. ivanovii*, una en aislamiento de chorizo y otro de sifón en un mismo expendio de la localidad del Líbano.

Se detectó la mayor prevalencia de *Listeria* spp. con el 14.6% que corresponde a 55 muestras positivas del total de muestras analizadas (377), aislamientos distribuidos en 8 de salsamentarías (2,1%), 38 expendios (10.1%) y 5 plantas de proceso (14.6).

En el ensayo de tolerancia a desinfectantes los aislamientos 29 y 42 fueron sensibles a Alquil dimetil bencil cloruro de amonio, mientras que todos los aislamientos fueron tolerantes a ácido peracético.

En las pruebas de Sensibilidad a antibióticos de *L monocytogenes* presentó una susceptibilidad del 100% para Ampicilina, Penicilina, Trimetoprim/Sulfatometoxazol, Azitromicina, Clindamicina, Cloranfenicol, Tetraciclina, Vancomicina.

RECOMENDACIONES

Basados en el diagnóstico de las BPM realizado en los diferentes eslabones de la cadena porcícola objeto de este estudio, con la presencia de *L. monocytogenes*, patógeno asociado a brotes de listeriosis, *L. ivanovii* y *Listeria* spp. es importante continuar con estudios para la identificación de estos microorganismos en diferentes tipos de alimentos, donde se den a conocer todas las vías de diseminación en los canales de producción y comercialización. Con el fin de prevenir y controlar la contaminación en las planta de proceso y expendios y salsamentarías, se recomienda:

1. Programar y mantener jornadas de capacitación, donde se concientice a los manipuladores de alimentos en: I) buenas prácticas de manufactura, II) Procedimientos Operativos Estándar de Saneamiento, III) limpieza y desinfección, para control de *L. monocytogenes*.
2. Evitar la formación de biopelículas implementando programas de limpieza y desinfección eficaces, verificando constantemente su cumplimiento, donde la rotación de desinfectantes evite la presencia de algunos microorganismos patógenos (*L. monocytogenes*) formadores de biopelículas en superficies de contacto.
3. Establecer el programa de monitoreo microbiológico de *L. monocytogenes* en equipos, superficies y utensilios de trabajo de objetos de trabajo (tajadora, la. mezcladora, el cutter, el molino, los mesones y cuchillos), con el fin de controlar la contaminación cruzada generada por el contacto la materia prima con las superficies y el ambiente. Es necesario revisar y monitorear la calidad microbiológica de la materia prima con el fin de establecer el programa de control de contaminación cruzada para minimizar el riesgo de contacto directo o indirecto

con utensilios, superficies y las áreas de proceso con producto terminado, evitando la recontaminación.

4. Tener en cuenta que el diseño de la infraestructura cuente con la separación de zonas de manipulación de materia prima y producto final, para prevenir la diseminación de *L. monocytogenes* en la planta.

5. Dar a conocer la importancia de la cadena de frío tanto en producción como en comercialización de la materia prima y los derivados en la planta de proceso, salsamentarías y expendios, controlando las temperaturas de congelación, de tratamiento térmico y de refrigeración.

6. Realizar campañas de promoción y prevención capacitando en especial la población de alto riesgo como embarazadas, niños, ancianos e inmunodeprimidos en el consumo de alimentos con riesgo de tener presencia de *L. monocytogenes*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Goulet V, Lepoutre A, Rocourt J, Courtieu AL, Dehaumont P, Veit P. 1993. L'épidémie de Listériose en France. Bilan Final et Résultats de L'enquête Épidémiologique, *Bulletin Epidémiologie Hebdomadaire*; 4: 13-14.
2. Qvist S, Sehested K, Zeuthen P. 1994. Growth Suppression of *Listeria monocytogenes* in a Meat Product, *International Journal of Food Microbiology*; 24: 283-293.
3. Salvat G, Toquin M, Michel Y, Colin P. 1995. Control of *Listeria monocytogenes* in the Delicatessen Industries: The Lessons of a Listeriosis Outbreak in France, *International Journal of Food Microbiology*; 25: 75-81.
4. Gandhi M. and Chikindas M. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*; 113, 1 –15.
5. Allerberger F. and Wagner M. 2009. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. J. Compilation. *Eu. Soc. Of Clin. Mic. Inf. Dis.*; 16, 16-23.
6. Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004, Capitulo 2.1 0.1 4 *Listeria monocytogenes*.
7. Belalcazar M, Poutou R, Torres K, Gallegos J, Torres O, Carrascal A. 2005. *Listeria monocytogenes* y Listeriosis Animal, *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica*; 8 (2) 95-101.
8. Torres K, Sierra SC, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. 2005. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, Microorganismo Zoonótico Emergente, *Revista MVZ-Córdoba*; 10 (1) 511-543.

9. Schöbitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. 2009. *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*; 1: 1-8.
10. Rocourt J. 1996. Risk factors for Listeriosis. *Food Control*, 7: 195-202.
11. Guillet C, Join-Lambert O, Le Monnier A, Leclercq A, Mechaï F, Mamzer-Bruneel MF, Bielecka M, Scotti P, Vazquez-Boland J, Lostholary O, and Lecuit M. 2010. Human Listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging infectious Diseases*; 16, 1.
12. Lawrence L. & Gilmour A. 1991. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and farms the poultry processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int. J. Food Microbiol.* 12, 14-70.
13. Korkeala H, Siitonen A. 2003. *Listeria monocytogenes*. Isolates from Invasive Infections: Variation of Sero and Genotypes during an 11 Year Period in Finland, *Journal of Clinical Microbiology*; 41 (4) 1694-1700.
14. Doumith M, Cazalet C, Somies N, Frangeul L, Jacquet C, Kunts F, Martin P, Cossart P, Glaser P, and Buchierser C. 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and Immunity*; 72, 1072-1083.
15. Ueda F, Anahara R, Yamada F, Mochizuki M, Ochiai Y, Hondo R. 2005. Discrimination of *Listeria monocytogenes* contaminated commercial Japanese meats. *International Journal of Food Microbiology*; 105: 455-462.
16. Thevenot D, Delignette-Muller M, Christieans S, and Vernozzy-Rozand C. 2005. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in 13 dried sausage processing plants and their products. *Int. J. Food Microbiol.* 102, 85-94.

17. López V, Suárez M, Chico I, Navas J, and Martínez J. 2006. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? *Rev. Argentina de Microbiología*, 38, 224-234.
18. Betancourt O, Villagrán K, Gutiérrez E, Mayorga M. and Melgarejo P. 2010. Serotypes of *Listeria monocytogenes* isolates on food produced in cautin providence, Chile. *Rev. Cient. FVC-LUZ*, 5, 529-536.
19. Inoue S, Katagiri K, Terao M, Maruyama T. 200. RAPD and actA genotyping of *Listeria monocytogenes* isolates of human listeriosis, the intestinal contents of cows and beef. *Microbiol Immunol.* 45:127-33.
20. Schlech W, Lavigne P, Bortolussi R, Allen E, Wort A, Hightower A, Johnson S, King S, Nicholls E. and Broome V. 1983. Epidemic Listeriosis evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.*; 308, 203-206.
21. Doyle M, Beuchat L. 2007. Food Microbiology fundamentals and frontiers; 1038 P: 457.
22. Medrano M, Restrepo S y Vanegas M. 2006. Tipificación molecular de *Listeria monocytogenes* aisladas de muestras clínicas y alimentos. *Biomédica*, 26, 442-450.
23. Barmpalia I, Geornarasl, Belk K, Scanga J, Kendall P. and Smith G. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* on frankfurters with antimicrobials in the formulation and by dipping in organic acid solutions. *J, Food Prot.*, 67, 2456-2464.
24. Orsi R, Henk C, Bakker D. and Wiedmann M. 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 76-96.
25. Murphy R. and Berrang M. 2002. Thermal lethality of *Salmonella Senftenberg* and *Listeria innocua* on fully cooked and vacuum

packaged chicken breast strips during hot water pasteurization. *J. Food Prot.*; 65, 1561-1564.

26. Vanegas M, Vega C, Martínez A, Forero P, & Casas C. 2005. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de cárnicos embutidos en supermercados y plazas de mercado de Bogotá. Memorias VIII congreso latinoamericano de microbiología e higiene de alimentos. Bogotá, Mayo 18-21 de 2005, pag 27.
27. Vera H, Ferro C, Triana L. 2006. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en derivados cárnicos cocidos para directo consumo, analizados en el laboratorio de Salud Pública de Bogotá 1 de septiembre 2001 - 31 agosto del 2004. Laboratorio de Salud Pública. Bogotá: Secretaria Distrital De Salud; 2006 [acceso 14 de Julio de 2009]. Disponible en (<http://www.docstoc.com/docs/3180422/PREVALENCIA-DE-Listeria-monocytogenes-EN-DERIVADOS-CARNICOS-COCIDOS-PARA-CONSUMO>).
28. Gamboa-Marín A, Buitrago S, Pérez-Pérez K, Mercado M, Poutou-Piñales R, Carrascal-Camacho A. 2012. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in pork meat and other processed products from the Colombian swine industry. *Rev.MVZ Córdoba* 17(1):2827-2833.
29. Velazco C. 2008. La experiencia colombiana en la reorganización de productores. Asociación Colombiana de Porcicultores. Querétaro. Ppt.
30. CONPES-3458. 2007. Política nacional de sanidad e inocuidad para la cadena porcícola. Bogotá.
31. FINAGRO. 2010. AVICULTURA. Sistema de Información Sectorial. <http://www.finagro.gov.co>. 2010.
32. Castellanos JG, Rodríguez JC, Daza NE, Toro W, Domínguez Zafra Y, Guerrero GH, González F, Ramos H, Casas Z. 2011. Agenda de

investigación y desarrollo tecnológico en cadenas productivas para la cadena cárnica porcina– Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Proyecto transición de la agricultura. Bogotá.

33. ACP-FNP 2012. Análisis de coyuntura del sector porcicultor. www.porcicol.org.co.
34. Cruz J. 2009. Previsiones del comercio mundial de carne ante la coyuntura económica actual. EUROCARNE No. 179. Septiembre, www.eurocarne.com.
35. Castellanos O, Torres L, Domínguez K. 2009. Manual metodológico para la definición de agendas de investigación y desarrollo tecnológico en cadenas productivas agroindustriales. Grupo de investigación y desarrollo en gestión, productividad y competitividad – Biogestión Universidad Nacional de Colombia, Proyecto Transición de la Agricultura – Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá.
36. Ruiz Z, Poutou R, Carrascal A. 2008. Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp. *Nova- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 201-218.
37. Vázquez-Boland J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Dominguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology*, 14, 3, 584-640
38. Jinneman KC, Hill WE. 2001. *Listeria monocytogenes* lineage group classification by MAMA-PCR of the listeriolysin gene. *Curr Microbiol* 43 (2):129-33.
39. Liu D. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* 55 (Pt 6):645-59.

40. Peres N, Lange C, Brito M, Arcuri E, and Cerqueira M. 2010. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62, 4,973-979.
41. Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR. 2010. *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* 60 (Pt 6):1280-8.
42. Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PA, Le Fleche-Mateos A, Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Monnier A. 2010. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 60 (Pt 9):2210.
43. Lundén J, Tolvanen R, Korkeala H. 2004. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J Dairy Sci* 87: E6-E12.
44. Alcayaga S, Hott B. 2008. *Listeria* y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. *Rev Chil Salud Pública* 2008; Vol 12 (3): 188-195.
45. Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol Rev* 29 (5):851-75.
46. Rojas C, Vargas P. 2008. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en Marcha*, Vol. 21-2, Abril-Junio, P. 9-16
47. Rivera FHP, Wesley I, Hurd S, Simoes D, Sosa A, Rivera S. 2006. Determinación Microbiológica y Molecular de *Listeria* sp. y *Listeria monocytogenes* en Cerdas a nivel de una planta beneficiadora en EUA. *Rev Cient (Maracaibo)* 16 (3).
48. Jeyaletchumi P, Tunung R, Margaret S, Son R, Farinazleen M, Cheah YK. 2010. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods, *Int. Food Res J.*, 17: 1-11.

49. Jadhav S, Bhawe B and Palombo E. 2012. Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods* Volume 88, Issue 3, March 2012, Pages 327–341
50. Espaze E, Rocourt J, Courtieu A. 1991. La Listeriose en France en 1989. Etude à Partir des Souches Adressées au Centre National de Référence. *Bulletin Epidémiologie Hebdomadaire*; 3: 9-10.
51. Jensen V, Harty J, Jones B. 1998. Interactions of the Invasive Pathogens *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, and *Shigella flexneri* with M Cells and Murine Peyer's Patches. *Infect Immun*; 66: 3758-3766.
52. Pan Y, Breidt F, Gorski L. 2010. Synergistic effects of sodium chloride, glucose, and temperatura on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* serotype 1/2 a *Listeria spp* and 4b strains.
53. Swaminathan B, Gerner-Smidt P. 2007. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 9 (10):1236-43.
54. Rocourt J, BenEmbarek P, Toyofuku H, Schlundt J. 2003. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35 (3):263-7.
55. Rocourt J, Buchrieser C. 2007. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification. In: Ryser ET, Marth EH, editors. *Listeria*, listeriosis, and food safety. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press. p. 1-20.
56. Swaminathan B, Rocourt J, Bille J. 1995. *Listeria*, in *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology Press: Washington. p. 341-348.

57. Wong HC, Chao WL, Lee SJ. 1990. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. *Appl Environ Microbiol* 56 (10):3101-4.
58. Cocolin L, Stella S, Nappi R, Bozzetta E, Cantoni C, and Comi G. 2005. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *Int J Food Microbiol*, 103, 167-178.
59. FSAI. 2005. The control and management of *Listeria monocytogenes* contamination of food. Food Safety Authority of Ireland. Disponible en: http://www.fsai.ie/resources_and_publications.html [acceso: 21-6-11].
60. Bell C, Kyriakides A. 2000. *Listeria: Una Aproximación Práctica al Microorganismo y su Control*, Zaragoza, España: Editorial Acribia S.A. 1-230.
61. Molina S, Mercado M, Carrascal A. 2009. Efecto de tiempo y temperatura de cocción de chorizos inoculados artificialmente con *Listeria monocytogenes*. *Universitas Scientarium*. 14, 198-205
62. Lungu B, Ricke S, Johnson M. 2009. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe*. 15, 7-17.
63. Beaufort A, Cornu M, Bergis H, Lardeux AL, & Lombard B. 2008. Technical guidance document on shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Community Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. http://www.fsai.ie/uploadedFiles/EU_Guidance_shelflife_listeria_monocytogenes_en.pdf Accessed 01.12.10.
64. Gormley FJ, Little CL, Grant KA, de Pinna E, McLauchlin J. 2010. The microbiological safety of ready-to-eat specialty meats from markets and

Listeria spp, *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*. Volume 27, Issue 2, April 2010, Pages 243–249

65. Xie J, Hong Sun X, Pan J, Zhao Y. 2012. Physicochemical properties and bactericidal activities of acidic electrolyzed water used or stored at different temperatures on shrimp. *Food Research International*. Volume 47, Issue 2, July 2012, Pages 331–336.
66. Sleator R, Gahan C, and Hill C. 2003. A Postgenomic Appraisal of Osmotolerance in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1, 1-9.
67. Cagri A, Yaldirak G, Simsek M, Bozkir H, Eren M. 2011. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two kasar cheese processing environments. *Food Control*. 22 762-766.
68. Qiu XS & Wu VCH. 2007. Evaluation of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* in ground beef with cranberry concentrate by Thin Agar Layer Method. *J. Rapid Methods and Auto. in Microbiol.* 15: 280-292.
69. Campdepadrós M, Stchigel AM, Romeu M, Quilez J, Solà R. 2012. Effectiveness of two sanitation procedures for decreasing the microbial contamination levels (including *Listeria monocytogenes*) on food contact and nonfood contact surfaces in a dessert-processing factory. *Food Control*, v. 23, n. 1, p. 26-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.017>
70. Grinstead D. 2009. Cleaning and sanitation in food processing environments for the prevention of biofilm formation, and biofilm removal. In *Biofilms in the Food and Beverage Industries* ed. Fratamico, P. M., Annous B. A. and Gunther IV, N. W. pp. 331-358. Cambridge: Woodhead.

71. Trinetta V, Vaida R, Xua Q, Lintonb R, Morgana M. 2012. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat food processing equipment by chlorine dioxide gas. Volume 26, Issue 2, August 2012, Pages 357–362.
72. Wiedmann M. 2003. ADSA Foundation Scholar Award--An integrated science-based approach to dairy food safety: *Listeria monocytogenes* as a model system. *J Dairy Sci* 86 (6):1865-75.
73. Meinersmann RJ, Phillips RW, Wiedmann M, Berrang ME. 2004. Multilocus sequence typing of *Listeria monocytogenes* using hypervariable genes reveals clonal and recombination histories of three lineages. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(4):2193-2203.
74. Sauders B, Schukken Y, Kornstein L, Reddy V, Bannerman T, Salehi E, Dumas N, Anderson B, Massy J. & Wiedman M. 2006. Molecular epidemiology and cluster analysis of human listeriosis cases in three U.S. states. *J Food Prot*, 7, 1680-1689.
75. Jeffers G, Bruce J, McDonough P, Scarlett J, Boor K. and Wiedmann M. 2001. Comparative genetic characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human and animal listeriosis cases. *Microbiology*. 147, 1095-1104.
76. Guenter S, Huwyler D, Richard S, and Loessner M. 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. *App. Env. Microbiol*. 75, 1, 93-100.
77. Nadon CA, Woodward DL, Young C, Rodgers FG, Wiedmann M. 2001. Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* 39 (7):2704-7.
78. Chen Y, Ross W, Gray M, Wiedmann M, Whiting R, Scott V. 2006. Attributing risk to *Listeria monocytogenes* subgroups: dose response in relation to genetic lineages. *J. Food Prot*. 69, 335e344.

79. Roussel S, Félix B, Colanéri C, Vignaud ML, Dao TT, Marault M, Brisabois A. 2010. Semiautomated repetitive sequence based polymerase chain reaction compared to pulsed field gel electrophoresis for *Listeria monocytogenes* subtyping. *Foodborne Pathog Dis_ Sep*; 7(9):1005-12.
80. Ward T, Gorski L, Borucki M, Mandrell R, Hutchins J. and Pupedis K. 2008. Intraspecific phylogeny and Lineage Group Identification Based on the *prfA* Virulence Gene Cluster of *Listeria monocytogenes*. *Journal Bacteriology*. 186, 15, 4994-5002.
81. Kayal S, Charbit A. 2006. Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol Rev* 30 (4):514-29.
82. Kastbjerg V, Halberg M, Gram L, and Ingmer H. 2010. Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *App. Env. Microb.* 76, 1, 303-309
83. Cossart P, Vicente MF, Mengaud J, Baquero F, Perez-Diaz JC, Berche P. 1989. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* 57 (11):3629-36.
84. khelef N, Lecuit M, Buchrieser C, Cabanes D, Dussurget O, Cossart P. 2006. *Listeria monocytogenes* and the Genus *Listeria*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The prokaryotes, A Handbook on the Biology of Bacteria*. 3rd ed. New York: Springer. p. 404-76.
85. Jaradat Z, Bhuni, A. 2002. Glucose and Nutrient Concentrations Affect the Expression of a 104-Kilodalton *Listeria* Adhesion Protein in *Listeria*

monocytogenes. Applied and Environmental Microbiology, 68(10): 4876-4883.

86. Chico-Calero I, Suarez M, Gonzalez-Zorn B, Scotti M, Slaghuis J, Goebel W, Vazquez-Boland JA. 2002. Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. Proc Natl Acad Sci U S A 99 (1):431-6.
87. Suárez M, González-Zorn B, Vega Y, Chico-Calero I, Vázquez-Boland J. 2001. A role for ActA in epithelial cell invasion by *Listeria monocytogenes*. Cellular Microbiology. Volume 3, Issue 12, pages 853–864,
88. Kathariou S. 2002. *Listeria monocytogenes* Virulence and Pathogenicity, a Food Safety Perspective. Journal of Food Protection®, Volume 65, Number 11, 1 November 2002, pp. 1811-1829(19).
89. Sánchez F, Mata V, Espinoza A, Villareal L. 2006. Incidencia de especies de *Listeria* en una planta productora de alimentos congelados. *Ciencia UANL*. IX, 51-56.
90. European Food Safety Authority. 2010. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne out-breaks in the European Union in 2008. EFSA J. 8:1496.
91. Cisternas A, Lagos N, Galstuch J, González C, García C, Díaz J. 2002. Infección por *Listeria monocytogenes* y embarazo con buen resultado perinatal. Rev Chil Obstet Ginecol; 67(3): 237-241
92. Cordano A., Rocourt J., 2001. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Food in Chile. International Journal of Food Microbiology 70:175-178.
93. Noriega LM, Ibáñez S, González P. 2008. *Listeria monocytogenes*: Report of a rise in pregnant women and literature review. Rev Chilena Infectol; 25 (5):342-9.

94. Borucki MK, Call DR. 2003. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *J Clin Microbiol* 41 (12):5537-40.
95. Larraín D, Abarzúa F, de Jourdan F, Merino P, Belmar C, García P. 2008. Infecciones por *Listeria monocytogenes* en mujeres embarazadas: Experiencia del Hospital Clínico de la Pontificia Universidad Católica de Chile. *Rev Chil Infect*; 25: 337-42.
96. Meloni D, Galluzo P, Mureddu A, Piras F, Griffiths M and Mazzete R. 2009. *Listeria monocytogenes* in RTE foods marketed in Italy: prevalence and automated EcoRI ribotyping of the isolates. *International Journal of Food Microbiology*. 129, 166-173.
97. Briers Y, Klumpp J, Schuppler M, and Loessner M. 2011. Genome sequence of *Listeria monocytogenes* scott A, a clinical isolate from a food-borne listeriosis outbreak. *Jour. Bact.* 193, 16, 4284-4285
98. Schuchat A. 1997. *Listeriosis* and Pregnancy: Food for Thought. *Obstetric Gynecology Surveillance*. 52: 721-722
99. Dalton C B, Austin C C, Sobel J, Hayes P S, Bibb W F, Graves L M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med*; 336: 100-5.
100. Charpentier E. and Courvalin P. 1999. Antibiotic Resistance in *Listeria* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43, 9, 2103-2108.
101. Hof H. 2003. History and Epidemiology of Listeriosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35: 199-202.
102. Lyon SA, Berrang ME, FedorkaCray PJ, Fletcher DL, Meinersmann RJ. 2008. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from a poultry further processing plant. *Foodborne Pathogens and Disease* 5, 253–259.

- 103.** Michelet C, Avril JL, Arvieux C, Jacquelinet, Vu N & Cartier F. 1997. Comparative activities of new fluoroquinolones, alone or in combination with amoxicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, or rifampin, against intracellular *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41(1):60.
- 104.** Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2012. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Approved Guideline (M45-A). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 105.** Chen B, Pyla R, Kim T, Silva J, Jung Y. 2010. Antibiotic resistance in *Listeria* species isolated from catfish fillets and processing environment. *Lett. Appl. Microbiol.* 50, 626e632.
- 106.** Vanegas M, Correa N, Morales A, Martínez A, RúgelesA, Jiménez F. 2009. Antibiotic resistance of bacteria isolated from biofilms in a food processing plant. *Rev.MVZ Cordoba* vol.14 no.2.
- 107.** Salamano R, Braselli A, Hoppe A, Monteghirfo R, Silva T. 2005. Neurolisteriosis in adults: report of six clinical cases. *Arq Neuropsiquiatr.* Dec; 63(4):1063-9.
- 108.** Morosi S, Francisci D, & Baldelli F. 2006. A case of rhombencephalitis caused by *Listeria monocytogenes* successfully treated with linezolid. *J Infect* 52, e73–e75.
- 109.** Troxler R, Von Graevenitz A, Funke G, Wiedemann B, and Stock I. 2000. Natural antibiotic susceptibility of listeria species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 525.
- 110.** Vela A, Fernández-Garayzábal J, Latre M, Rodríguez A, Domínguez L, Moreno M. 2001. Antimicrobial Susceptibility of *Listeria*

monocytogenes Isolated from Meningoencephalitis in Sheep. International Journal of Antimicrobial Agents, 17: 215-220.

111. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-First Informational Supplement (M100-S21). Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
112. Granier S, Moubareck C, Colaneri C, Lemire A, Roussel S, Dao T, Courvalin P, and Brisabois A. 2011. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolates from Food and the Environment in France over a 10-Year Period. *App.Env. Mic.*,p. 2788-2790
113. Davis JA, and Jackzon CR. 2009. Comparative antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* and *L. welshimeri*. *Microb. Drug Resist.* 15: 27-32
114. Fillioussis G, Johanson A, Frey J, and Perreten V. 2009. Prevalence genetic diversity and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from open-air food markets in Greece. *Food Control* 20:314-317.
115. Harakeh S, Zouhairi O, Baydoun E, Babour E, and Alwan N. 2009. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Science of the total environment.* 407, 4022-4027
116. Biavasco F, Giovanetti E, Miele A, Vignaroli C, Facinelli B, and Varaldo P. 1996. *In vitro* conjugative transfer of vanA vancomycin resistance between *Enterococci* and *Listeriae* of different species. *Eur J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 50-59.
117. Rahimi E, Ameri M, Momtaz H. 2010. Prevalence and microbial resistance of *Listeria* species isolates from milk and dairy products in Iran. *Food Control.* 21: 1448-1452

- 118.** Schlech W, Lavigne P, Bortolussi R, Allen A, Haldane E, Wort A, Hightower A, Johnson S, King S, Nicholls E, and Broome C. 1983. Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. *N Engl. J. Med.* 308: 203-206
- 119.** Jacquet C, Catimel B, Brosch R, Buchrieser C, Dehaumont P, Goulet V, Lepoutre Veit P, and Rocourt J. 1995. Investigations related to the epidemic strain involved in the french listeriosis outbreak in 1992. *App. Env. Mic.* 61, 6 2242-2246.
- 120.** Wagner C. 2012. Factores de riesgo asociados a *Listeria monocytogenes* en plantas colombianas procesadoras de derivados cárnicos porcinos (salchicha, jamón y chorizo). Tesis. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana.
- 121.** Crespo M, Vélez J, Castañeda C, Hoyos F, López M, Salazar J. 1999. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un Hospital de Tercer Nivel, *Colombia Médica*; 30 (2): 89-98.
- 122.** Chávez J, Calume M, Guerrero J. 2009. Caso de meningitis bacteriana relacionado con el consumo de queso fresco contaminado con *Listeria monocytogenes*. *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 14:305-10.
- 123.** Zúñiga M, Miranda A, Oñate J, Martínez E, Bolívar G. 2011. Múltiples abscesos cerebrales por *Listeria monocytogenes* en un paciente con infección por el virus de inmunodeficiencia humana, primer caso descrito en Colombia. *Infectio.* 15(1): 44-48
- 124.** Vergara J. 2004. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en Quesos Frescos Distribuidos en Bogotá D.C. Tesis Universidad de Los Andes. 36p p.
- 125.** Rueda A. 2005. Detección de *Listeria monocytogenes* por PCR en tiempo real en muestras de leche cruda entera destinada para el

consumo humano en Colombia. Tesis de maestría en microbiología. Universidad de los Andes.

126. Ryser E & Marth E. 2007. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, 3rd Ed. New York: Marcel Dekker.
127. Chasseignaux E, Toquin MT, Ragimbeau C, Salvat G, Colin P, Ermel G. 2001. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry- and pork-processing plants. *J Appl Microbiol* 91 (5):888-99.
128. Carrascal A, Contreras Y, and Sarmiento P. 2007. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca expedida en el municipio de Pamplona, Colombia. *Bistua*, 5, 49-57.
129. Midelet G, & Carpentier B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes* from various materials to beef. *Applied Environmental Microbiology*, 68, 4015-4024.
130. Norwood DE and Gilmour A. 2001. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *J. Appl. Microbiol.* 33, 320-324.
131. Carpenter B., Chassaing D. 2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int J Food Microbiol*; 97:111-122.
132. Perni S, Andrew PW & Shama G. 2005. Estimating of maximum growth rate from microbial growth curves: definition is everything. *Food Microbiol.* 22 (6), 491-495.
133. Rieu A, Lemaître JP, Guzzoc J, Piveteau P. 2008. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 126, Issues 1–2, 15 August 2008, Pages 76–82

- 134.** Rieu A, Briandet R, Habimana O, Garmy D, Guzzo J and Piveteau P. 2008. *Listeria monocytogenes* EGD-e Biofilms: No Mushrooms but a Network of Knitted Chains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4491–4497.
- 135.** Zhao T, Doyle M, & Zhao P. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganism. *Appl and Environm Microbiol.* 70, 3996-4003.
- 136.** Nilsson R, Ross T, Bowman J. 2011. Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *Int. Jour. Fodd Microb.* 150, 14-24
- 137.** Rayner J, Veeh R, Flood J. 2004. Prevalence of microbial biofilms on select fresh produce and household surfaces. *Int Journal of Food Microbiology.* Volume 95, Issue 1, 15 August 2004, Pages 29–39
- 138.** Navia D, Villada H, Mosquera S. 2010. Biofilms in the food industri. *Fac. Cienc. Agropec.* 8, 2.
- 139.** Habimana O, Meyrand M, Meylheuc T, Kulakauskas S, Briandet R. 2009. Genetic Features of Resident Biofilms Determine Attachment of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol*24, 7814–7821.
- 140.** Aznar R & Alarcon B. 2003. PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *Journal of Applied Microbiology.* Volume 95, Issue 5, pages 958–966
- 141.** Aase B, Sundheim G, Langsrud S, Rørvik LM. 2000. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.*;62:57-63.
- 142.** Shetty A, McLauchlin J, Grant K, O'Brien D, Howard T, And Davies E. 2009. Outbreak of *Listeria monocytogenes* in an oncology unit associated with sandwiches consumed in hospital. *Journal of Hospital Infection.* 72, 332-336.

- 143.** Rossi M, Paiva A, Tornese M, Chianelli S y Troncoso A. 2008. *Listeria monocytogenes* outbreaks: A review of the routes that favor bacterial presence. *Rev Chil Infect*; 25 (5): 328-335
- 144.** Tom R, Rasmussen S, Fazilb A, Paolib G, Sumnera J. 2009. Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat meats in Australia. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 131, Issues 2–3, 31 May 2009, Pages 128–137.
- 145.** Gibbons I, Adesiyun A, Seepersadsingh N, Rahaman S. 2006. Investigation for possible source(s) of contamination of ready toe at meat products with *Listeria* spp. and other pathogens in a meat processing plant in Trinidad. *Food Microbiology*. 23, 359-366.
- 146.** Cornu M, Kalmokoffc M, Flandrois JP. 2011. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 73, Issues 2–3, 11 March 2002, Pages 261–274
- 147.** Cressy HK, Jerret AR, Osborne CM and Bremer PJA. 2003. Method for the reduction of numbers of *Listeria monocytogenes* cells by freezing in combination with an essential oil in bacterical media. *Journal of Food Protection*. 66, 390-395.
- 148.** Mytle N, Andreson G, Doyle M, Simth M. 2006. Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chickens frankfurtes. *Food Control*. 17, 102-107.
- 149.** Ibrahim A and MacRaelC. 1991. Incidence of *Aeromonas* and *Listeria* spp. in red meat and milk samples in Brisbane, Australia. *Int. J. Food Microbiol*. 12: 263–269.
- 150.** Uyttendaele M, DeTroy P, and Debevere J. 1999. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different types of meat products on the Belgian retail market. *Int. J. Food Microbiol*. 53: 75–80.

151. Loncarevic S, Milanovic A, Caklovica F, Tham W, and Danielsson-Tham. 1994. Occurrence of *Listeria* species in an abattoir for cattle and pigs in Bosnia and Hercegovina. *Acta Vet. Scand.* 35: 11–15.
152. Nitcheva L, Yonkova V, Popov V, and Maney C. *Listeria* isolation from foods of animal origin. *Acta Microbiol. Hung.* 1990. 37: 223–225.
153. Wang GH, Yan KT, Feng X, Chen S, Lui A, and Kokubo Y. 1992. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from retail meats in Beijing. *J. Food Prot.* 55: 56–58.
154. Norrung B, Andersen JK, and Schlundt J. 1999. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods in Denmark. *Int. J. Food Microbiol.* 53: 195–203.
155. Jay J.M. 1996. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. *Food Contr.* 7: 209–214.
156. Samelis J and Metaxopoulos J. 1999. Incidence and principal sources of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* contamination in processed meats and a meat processing plant. *Food Microbiol.* 16:465–477.
157. Sheridan JJ, Duffy G, McDowell DA, and Blair IS. 1994. The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. *Int. J. Food Microbiol.* 22: 105–113.
158. Maini P, Gaiani R, Piva I, Zampino L, Biccocchi B, and Bucci G. 1989. *Listeria* spp. and enteric pathogens in raw meat: a survey in the Ferrara area. *Boll. Ist. Sieroter. Milan.* 68: 42–44.
159. Villari P, D’Errico MM, Prospero E, Grasso GM, and Romano F. 1991. Isolation of *Listeria* spp. in fresh meats produced in Campania. *L’igiene Moderna.* 96: 274–278.

- 160.** Comi G, Frigerio R, and Cantoni C. 1992. *Listeria monocytogenes* serotypes in Italian meat products. *Lett. Appl. Bacteriol.* 15: 168–171.
- 161.** Ryu CH, Igimi S, Inoue S, and Kumagai S. 1992. The incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. *Int. J. Food Microbiol.* 16: 157–160.
- 162.** Choi YC, Cho SY, Park BK, Chung BD, and Oh DH. 2001. Incidence and characterization of *Listeria* spp. from food available in Korea. *J. Food Prot.* 64: 554–558.
- 163.** Heredia N, Garcia S, Rojas G, and Salazar L. 2001. Microbiological condition of ground meat retailed in Monterrey, Mexico. *J. Food Prot.* 64: 1249–1251.
- 164.** Soriano JM, Rico H, Moltó JC, and Mafies J. 2001. *Listeria* species in raw and ready-to-eat foods from restaurants. *J. Food Prot.* 64: 551–553.
- 165.** Breer C and Schöpfer K. 1988. *Listeria* and food. *Lancet* II: 1022.
- 166.** Sim J, Hood D, Finnie L, Wilson M, Graham C, Brett M, Hudson JA. 2002. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats. *Lett Appl Microbiol* 35 (5):409.
- 167.** Adesiyun AA, 1993. Prevalence of *Listeria* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp. and toxigenic *Escherichia coli* on meat and seafoods in Trinidad. *Food Microbiol.* 10: 395–403.
- 168.** Gilbert RJ. 1991. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in foods in the United Kingdom. In *Proc.Int. Conf. Listeria Food Saf.* Laval, France, pp. 82–88.
- 169.** MacGowan AP, Bowker K, McLauchlin J, Bennett PM, and Reeves DS. 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of

- Listeria* spp. in shop-bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.* 21: 325–334.
- 170.** Wilson IG. 1995. Occurrence of *Listeria* species in ready to eat foods. *Epidemiol. Infect.* 115:519–526.
- 171.** Johnson JL, Doyle MP, and Cassens RG. 1990. Incidence of *Listeria* spp. in retail meat roasts. *J. Food Sci.* 55: 572–574.
- 172.** Yu LSL, Prasai RK, and Fung DYC. 1995. Most probable number of *Listeria* species in raw meats detected by selective motility enrichment. *J. Food Prot.* 58: 943–945.
- 173.** Saide-Albornoz JJ, Knipe CL, Murano EM, and Beran GM. 1995. Contamination of pork carcasses during slaughter, fabrication, and chilled storage. *J. Food Prot.* 58: 993–997.
- 174.** Duffy EA, Belk KE, Sofos JN, Bellinger GR, Pape A, and Smith GC. 2001. Extent of microbial contamination in United States pork retail products. *J. Food Prot.* 64: 172–178.
- 175.** Kanuganti SR, Wesley IV, Reddy PG, McKean J, and Hurd HS. 2002. Detection of *Listeria monocytogenes* in pigs and pork. *J. Food Prot.* 65: 1470–1474.
- 176.** Farber, J.M., G.W. Sanders, and M.A. Johnston. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *J. Food Prot.* 1989. 52: 456–458.
- 177.** FSIS. 2004. http://www.fsis.usda.gov/OA/recalls/rec_pr.htm. (Tomado el 23/12/11)
- 178.** Poutou R, Burbano M, Sierra S, Torres K, Carrascal A, and Mercado M. 2005. Estandarización de la Extracción de ADN y Validación de la PCR Múltiple para Detectar *Listeria monocytogenes* en

Queso, Leche, Carne de Res y Pollo. Universitas Scientiarum, 10: 61-78.

- 179.** International Organization for Standardization. ISO-11290:1996 Microbiology of food and animals feeding stuffs: horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* I. Detection method. Geneva, Switzerland
- 180.** FAOSTAT/FAO. 2007. Dirección de estadísticas de la FAO. Producción de carne de cerdo a nivel Mundial; [en línea]. [fecha de acceso 3 de septiembre de 2011]. URL disponible en: <http://193.43.36.221/site/368/DesktopDefault.aspx?PageID=368#ancor>.
- 181.** Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS Microbiol Rev 29 (5):851-75.
- 182.** Burbano E, Carrascal A, Mercado M, Poutou R. 2003. Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en Leches. Normas y Calidad, (57): 39-48.
- 183.** Bansal NS. 1996. Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Lett Appl Microbiol 22 (5):353-6.
- 184.** Burbano E. 2002. Validación De PCR Para La Detección De *Listeria monocytogenes* En Leches. Tesis de Maestría. Pontificia Universidad Javeriana. 117 p.
- 185.** Bubert A, Hein L, Rauch M, Lehner A, Yoon B, Goebel W, Wagner A. 1999. Detection and Differentiation of *Listeria* spp. by a Single Reaction Based on Multiplex PCR. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 65, No. 10. p. 4688–4692.

186. Ruiz-Bolivar Z, Neuque-Rico MC, Poutou-Piñales RA, Carrascal-Camacho AK, Mattar S. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* food isolates from different cities in Colombia. Foodborne Pathog Dis. Aug;8(8):913-9.
187. Instituto Colombiano de normas técnicas y certificación. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de prueba y requisitos (fase 1). Bogotá: ICONTEC, 2003p: il(NTC 5150).
188. Greemberg R, Daniela S, Flanders D, Eley J. 2005. Epidemiología clínica. México D. F. Ed Manual Moderno, 4 ed.
189. Tapia JA. 1995. Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica, Euned.
190. Hernández-Chavarría F. 2002. Fundamentos de epidemiología: el arte detectivesco de la investigación epidemiológica. Euned.
191. Ministerio de Salud Colombia. 1997. Decreto 3075 por el cual se reglamenta la obligatoriedad de las Buenas Prácticas de Manufactura en las industrias de alimentos.
192. Ministerio de la Protección Social de Colombia. 2007. Resolución 4282. Por la cual se establece el reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios y de inocuidad de la carne y productos cárnicos comestibles de la especie porcina destinada para el consumo humano y las disposiciones para su beneficio, desposte, almacenamiento, comercialización, expendio, transporte, importación o exportación.
193. Presidencia de la Republica Colombiana. DECRETO 2278 de 1982. Por el cual se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979 en cuanto al sacrificio de animales de abasto público o para consumo humano y el procesamiento, transporte y comercialización de su carne.

- 194.** Torres KJ, Poutou R, Carrascal A, Sierra S, Mercado M. 2004. Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. *MVZ-Córdoba* 9 (2):414-27.
- 195.** Zhang, W., Jayarao, B., Knabel, S. 2004. Multi-Virulence-Locus Sequence Typing of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(2): 913-920.
- 196.** Buchrieser C, Rusniok C, Garrido P, Hain T, Scotti M, Lampidis R, Kärst U, Chakraborty T, Cossart P, Kreft J, Vazquez-Boland J, Goebel W, Glaser P. 2011. Complete Genome Sequence of the Animal Pathogen *Listeria ivanovii*, Which Provides Insights into Host Specificities and Evolution of the Genus *Listeria*. *J Bacteriol.* December; 193(23): 6787–6788.
- 197.** Kovacevi J, Mesak L, Allen K. 2012. Occurrence and characterization of *Listeria* spp. in ready-to-eat retail foods from Vancouver, British Columbia. *Food Microbiology* 30 372-378.
- 198.** Murphy N, McLauchlin J, Ohai C, Gran K. 2007. Construction and evaluation of a microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. Volume 120, Issues 1–2, 30 November, Pages 110–119.
- 199.** Chasseignaux E, G rault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G, 2002. Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiol. Lett.* 210, 271-275.
- 200.** Tompkin BA. 2002. Control of *Listeria* in the food-processing environment. *J. Food Protection.* 65(4): 709-723.
- 201.** Srinivasan V, Nam HM, Nguyen LT, Tamilselvam B, Murinda SE, Oliver SP. 2005. Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms. *Foodborne Pathog Dis.* 2005 Fall;2(3):201-11.

- 202.** Santos I, Vergel CB. 2002. Determinación de los mecanismos genéticos de resistencia a desinfectantes en *Listeria monocytogenes*. Microbiología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. pg. 81.
- 203.** De Curtis ML, Franceschi O, De Castro N. 2002. *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. ALAN v.52 n.3.
- 204.** Martino TK, PérezA, de los Reyes M, Suárez F, Lara C. 2005. Determinación de *Listeria* spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. Rev Cub. Salud Pú. Vol. 31 No. 3, Ciudad de La Habana, jul.-sep. ISSN 0664-3466 versión on-line <http://www.sld.cu/sitios/revsalud/index.php>.
- 205.** Garmendia G, Vero S. 2005. Métodos para desinfección de frutas y hortalizas. UDELAR.
- 206.** Rodgers SL, Cash NJ, Siddiq M, Ryser ET. 2004. A comparasion of different chemical sanitizers for inactivating *Escherichia coli* O157:H7 y *Listeria monocytogenes* in solution and in apple, lettuce, strawberries and cantaloupe. Journal of Food Protection. 67.4:721-731.
- 207.** Stoporth JD, Samelis J, Sofos JN, Kendall PA and Smith GC. 2002. Biofilm formation by acidadapted and nonadapted *Listeria monocytogenes* in fresh beef decontamination washings and its subsequent inactivation with sanitizers. J. Food Prot. 65 (11), 1717-1727.

ANEXOS

Anexo 1. Identificación de la prevalencia *L. monocytogenes* en productos cárnicos y derivados (MADR-CIAT-UT).

IDENTIFICACIÓN DE LA PREVALENCIA *Listeria Monocytogenes* EN PRODUCTOS CÁRNICOS Y DERIVADOS (MADR CIAT UT)

FORMATO DE DIAGNÓSTICO SANITARIO DE EXPENDIOS CARNE Y DERIVADOS CÁRNICOS DE CERDO DEL DEPARTAMENTO DEL TOLIMA

OBJETIVO: Diagnosticar condiciones actuales de BPM en plantas de producción de Carne porcina y de Derivados cárnicos de cerdo en el Departamento del Tolima.

Específicos:

- Realizar la selección de los expendios a muestrear para la identificación de la prevalencia de *Listeria Monocytogenes* en Derivados Cárnicos de Cerdo.
- Conocer el estado higiénico-sanitario de expendios de carne de cerdo en cada municipio seleccionado del Departamento del Tolima.

Escribir y/o rellenar cada casilla de acuerdo a la situación del la planta visitada, con letra legible, en caso de no existir datos, plasmar lo faltante en observaciones. Favor no dejar ningún ítem sin responder.

A. DATOS GENERALES DE LA VISITA			
1. Municipio:			
1. Cajamarca	2. Chaparral	3. Espinal	4. Ibagué
5. Guamo	6. Villahermosa	7. Lésda	8. Libano
9. Marquita	10. Prado	11. Venadillo	12. Purificación
13. Armero Guayabal			
2. Anote el Código del lugar de acuerdo a codificación interna: _____			

B. PRODUCTO			
1. Numero de Cerdos/Semana que ingresan a planta de producción :			
2. ¿Conoce la procedencia de la materia prima?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
Nombre:			
3. ¿El origen de la carne es?			
1. Planta	0. Clandestino	8. Otro	9. No dato
Cual?			
4. ¿Tipo de carne?			
1. Porcina	2. Otro	8. No sabe	9. No dato
Cual?			
5. Los productos cárnicos procesados son:			
1. Jamón	2. Salchicha	3. Chorizo	4. Longaniza
5. Morcilla	6. Salchichón	7. Jamón y salchicha	8. Jamón y chorizo
9. Jamón y longaniza	10. Jamón y morcilla	11. Jamón y salchichón	12. Salchicha y chorizo
13. Salchicha y longaniza	14. Salchicha y morcilla	15. Salchicha y longaniza	16. Salchicha y morcilla
17. salchicha y salchichón	18. Chorizo y longaniza	19. chorizo y morcilla	20. chorizo y salchichón
21. Longaniza y morcilla	22. Longaniza y salchichón	23. Morcilla y salchichón.	24. Jamón, salchicha y chorizo
25. Jamón, salchicha y longaniza	26. Jamón, salchicha y morcilla	27. Jamón, salchicha y salchichón	28. Longaniza, morcilla y salchichón
29. Longaniza, morcilla y jamón	30. Longaniza, morcilla y salchicha	31. Longaniza, morcilla y chorizo	32. Jamón, Chorizo, Longaniza
33. Jamón, chorizo y morcilla	34. Jamón, chorizo y salchichón	35. Salchicha, chorizo y longaniza	36. Salchicha, chorizo y morcilla
37. Salchicha, chorizo y salchichón	38. Longaniza, salchichón y jamón	39. Longaniza, salchichón y salchicha	40. Longaniza, salchichón y chorizo
41. Morcilla, salchichón y jamón	42. Morcilla, salchichón y salchicha	43. Morcilla, salchichón y chorizo	44. Jamón, salchicha, chorizo y longaniza
45. Jamón, salchicha, chorizo y morcilla	46. Jamón, salchicha, chorizo y salchichón	47. Longaniza, morcilla, salchichón y jamón	48. Longaniza, morcilla, salchichón y salchicha

49. Longaniza, morcilla, salchichón y chorizo	50. Jamón, salchicha, longaniza y morcilla	51. Jamón, salchicha, morcilla y salchichón	52. Jamón, chorizo, longaniza y morcilla
53. Jamón, chorizo, morcilla y salchichón	54. Salchicha, chorizo, longaniza y morcilla	55. Salchicha, chorizo, morcilla y salchichón	56. Longaniza, morcilla, salchicha y chorizo
57. Longaniza, morcilla, salchicha y jamón	58. Longaniza, salchichón, salchicha y chorizo	59. Longaniza, salchichón, salchicha y jamón	60. Todos
6. ¿ La preparación de este producto es?			
1. Artesanal	2. Proceso industrial	9. No data	

C. LOCALIZACIÓN

1. Zona			
1. Urbano	3. Rural	4. Industrial	8. Otro
Cual?			

D. CALIDAD DE AGUA

1. Realiza análisis microbiológicos del agua?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
2. Con que periodicidad realiza estos análisis?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
3. Tiene tanques de almacenamiento?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
4. Realiza lavados periódicos de los tanques?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
4.1. Cada cuanto?			
5. El agua es potable?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
6. El origen del agua es?			
1. Acueducto Municipal	2. Acueducto propio	3. No sabe	9. No dato
8. Otro "Especifique"			
7. Cual?			

E. INSTALACIONES

1. Qué tipo de cadena de frío utiliza?			
0. No tiene	1. Congelación	2. Refrigeración	3. Congelación y Refrigeración
8. No sabe	9. No dato		
2. Registre Monitoreo temperatura:			
2. 1. Congelación:			
2. 2. Refrigeración:			
3. Realiza análisis en busca de plagas?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
4. Las instalaciones, los equipos y utensilios son de fácil limpieza y desinfección?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
5. El piso, paredes y techo del lugar de trabajo es de material lavable, con bordes redondos?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
6. Cuenta con suficientes drenajes?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
7. Las fuentes de luz (Ventanas y lámparas) se encuentran protegidas?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
8. La zona de corte está aislada?			

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
9. La zona de manipulación está aislada?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
10. El material donde se procesa es de:			
0. Madera	1. Plástico	2. Aluminio	3. Cerámica
4. Cemento	5. Acero inoxidable		9. No dato
11. Realiza periódicamente procesos de limpieza y desinfección?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
11. 1. Cada cuanto?			
11. 2. Con que?			
12. Tienen un programa de mantenimiento de equipos e instalaciones?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
13. Contrata servicios de laboratorio para monitorio de inocuidad del producto?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
14. Realiza Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES)?			
0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato

F. TRANSPORTE

1. Temperatura del carro transportador de materia prima:
2. Temperatura del carro transportador producto terminado:

G. EQUIPOS Y UTENSILIOS

Realizan desinfecciones periódicas de:

1. Cuchillos y Chairas

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------
 2. Sierras

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------
 3. Recipientes y canastillas plásticas

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------
 4. Guantes de malla de acero.

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------
- Cada cuanto?

H. PERSONAL

1. Tienen al día la capacitación de Manipuladores?

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------
2. Realizan monitoreo internos de buenas prácticas de higiene?

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------

K. MANEJO DE RESIDUOS

1. Tienen plan de manejo de residuos sólidos?

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------
2. El punto de basuras es distante de las zonas de trabajo?

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------
3. Tienen punto de disposición final de residuos sólidos?

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------
4. Realizan clasificación de basura?

0. No	1. Si	8. No sabe	9. No dato
-------	-------	------------	------------

NOMBRE DEL ENTREVISTADOR: _____

NOMBRE ENTREVISTADO: _____

Firmas:

Entrevistador

Entrevistado

OBSERVACIONES:

Anexo 2. Protocolos muestreo.

PROTOCOLO MUESTRAS DE CARNE Y DERIVADO CÁRNICO

Antes de realizar cualquier toma de muestra, el muestreador debe desinfectarse las manos con gel antibacteriano para proceder a colocarse los guantes estériles, para cada muestra en necesario que se realice el mismo procedimiento para evitar contaminación.

De igual manera se maneja un Acta de muestreo donde se deben registrar: el número de la muestra, descripción del lote, temperatura, humedad relativa y temperatura del medio ambiente



Fuente: MARD 3592-3594

Además se deben colocar adhesivos con el código correspondiente a cada muestra, cada uno de ellos con un color que indique si la muestra es para la identificación de *Listeria*.



Fuente: MADR 3592-3594

1. La muestra de carne debe ser de 100 gr la cual se colocar en una bolsa ziploc debidamente marcada.



Fuente: MADR 3592-3594

Una vez tomada la muestra esta debe almacenarse en neveras plásticas hasta su llegada a laboratorio.



Fuente: MADR 3592-3594

Luego de utilizar los guantes, se deben desechar en bolsas rojas y al papel kraft en donde viene envueltos los guantes en bolsa verde respectivamente.



Fuente: MARD 3592-3594

PROTOCOLO MUESTRAS DE AMBIENTE, MÉTODO DE HISOPOS EN SUPERFICIE

Antes de realizar cualquiera toma de muestra, el muestreador debe desinfectarse las manos con gel antibacteriano para proceder a colocarse los guantes estériles, para cada muestra en necesario que se realice el mismo procedimiento para evitar contaminación.

De igual manera se maneja un acta de muestreo donde se deben registrar: el número de la muestra, temperatura, humedad relativa y temperatura del medio ambiente



Fuente:MARD 3592-3594

Además se deben colocar adhesivos con el código correspondiente a cada muestra, cada uno de ellos con un color que indique si la muestra es para la identificación de *Listeria*.



Fuente:MARD 3592-3594

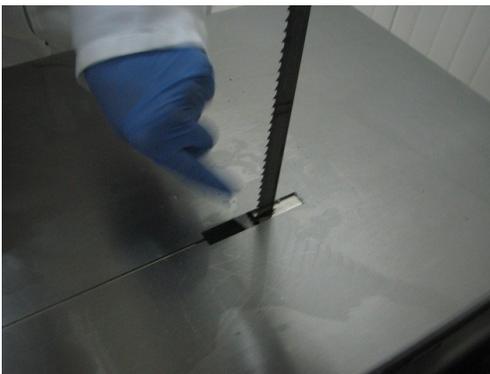
1. Tome el hisopo, gire la parte superior de este para que baje el buffer hacia el tubo.
2. Una vez se halla humedecido el hisopo, desenrosque este y proceda a tomar la muestra
3. Estos serán usados para muestrear sifones, cortinas, canastas, refrigerador, bandeja, cuchillo, mesones etc. (un hisopo para cada uno)



MARD 3592-3594



MARD 3592-3594



MARD 3592-3594



MARD 3592-3594

4. A continuación proceda a devolver el hisopo al tubo
5. Rotule el hisopo con el código indicado
6. No olvide tomar la temperatura de medio ambiente y la humedad relativa al tomar cada una de las muestras
7. Una vez tomada la muestra esta debe almacenarse en neveras plásticas hasta su llegada a laboratorio.



MARD 3592-3594

8. Para cada muestra es necesario limpiar las manos con gel antibacterial y cambiar de guantes y depositar estos en bolsa roja y al papel kraft en donde viene envueltos los guantes en bolsa verde respectivamente.



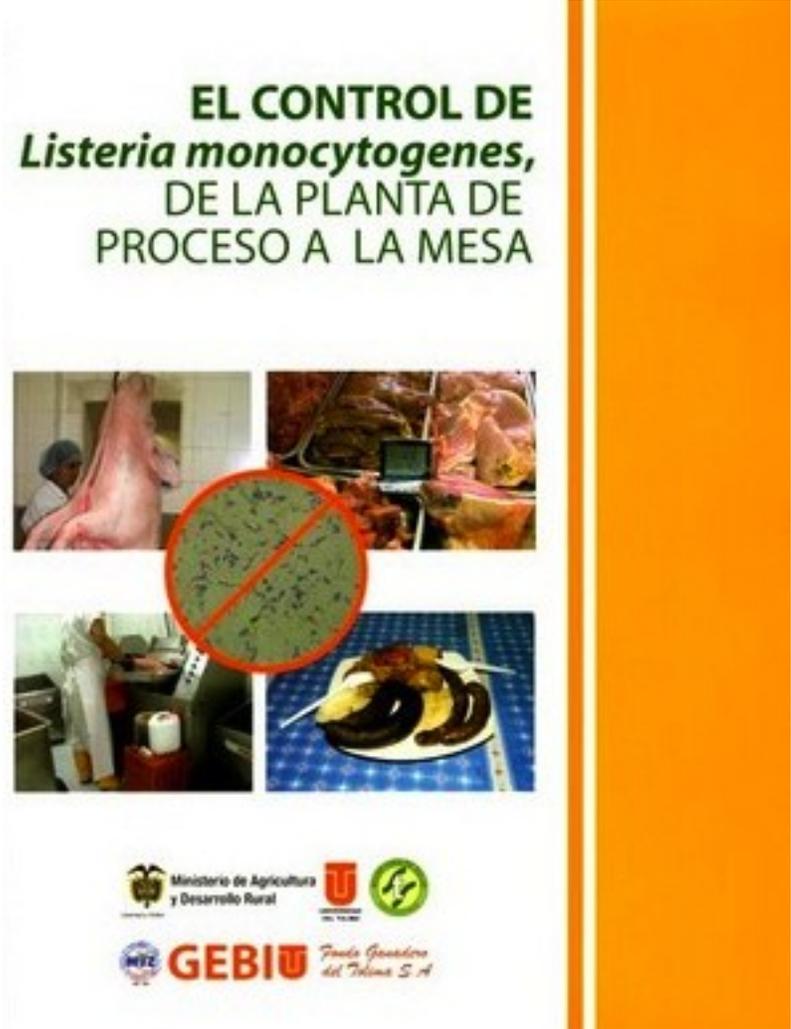
MARD 3592-3594

Anexo 3. Tabla resultados análisis moleculares.

Género	Especie	Origen	Tipo Muestra	Ciudad
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Expendio 8	Utensilios	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Planta Proceso 1	Materia prima	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Planta Proceso 2	Materia prima	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Expendio 29	Superficies	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>monocytogenes</i>	Expendio 26	Manipuladores	Mariquita
<i>Listeria</i>	<i>ivanovii</i>	Expendio 30	Chorizo	Líbano
<i>Listeria</i>	<i>ivanovii</i>	Expendio 30	Sifón	Líbano
<i>Listeria</i>	<i>Spp</i>	Expendio 8	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>Spp</i>	Expendio 8	Superficies	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>Spp</i>	Planta Proceso 1	Materia prima	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>Spp</i>	Planta Proceso 1	Materia prima	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>Spp</i>	Planta Proceso 1	Materia prima	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>Spp</i>	Planta Proceso 1	Equipos	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>Spp</i>	Expendio 9	Utensilios	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>Spp</i>	Expendio 9	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 9	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 9	Utensilios	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 9	Superficies	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 11	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 11	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 11	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 11	Utensilios	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 11	Superficies	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 12	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 12	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 12	Utensilios	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 12	Superficies	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Salsamentaria 17	Jamón	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Salsamentaria 19	Manipulador	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Salsamentaria 21	Equipos	Espinal
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Planta Proceso 2	Materia prima	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Planta Proceso 2	Materia prima	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Planta Proceso 2	Materia prima	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Planta Proceso 2	Materia prima	Ibagué

<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Planta Proceso 2	Materia prima	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 25	Chorizo	Mariquita
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 25	Chorizo	Mariquita
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 26	Chorizo	Mariquita
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 26	Chorizo	Mariquita
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 26	Superficies	Mariquita
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Salsamentaria 27	Equipos	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Salsamentaria 28	Equipos	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Salsamentaria 28	Superficies	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 29	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Salsamentaria 30	Equipos	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Salsamentaria 30	Superficie	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 30	Jamón	Líbano
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 29	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 31	Longaniza	Lérida
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 31	Chorizo	Lérida
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 32	Chorizo	Líbano
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 31	Longaniza	Lérida
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 33	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 33	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 33	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 34	Salchicha	Líbano
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 35	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 36	Chorizo	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 37	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 38	Chorizo	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 39	Longaniza	Ibagué
<i>Listeria</i>	<i>spp</i>	Expendio 40	Longaniza	Ibagué

Anexo 4. CONTROL DE *Listeria monocytogenes*, DE LA PLANTA DE PROCESO A LA MESA.



Ver PDF. En Cd