

**Optimización para la validación de métodos cualitativos en la detección
de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos producidos en el
departamento de Risaralda**

**INGRID TATIANA LONDOÑO GONZÁLEZ
ANA MARÍA NÚÑEZ RINCÓN**



Universidad Libre Seccional Pereira

Tesis de Pregrado

**Dirigida por
Elizabeth Castaño Moreno**

NOVIEMBRE DEL 2015

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE ANEXOS	6
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVO GENERAL	3
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4. MARCO TEÓRICO	4
4.1.1 Parte 1: Caracterización de <i>Listeria monocytogenes</i>	4
4.1.2 Producción del queso fresco a pequeña escala	4
4.1.3 Microbiología del queso.....	5
4.1.4 <i>Listeria monocytogenes</i>	5
4.1.5 Serotipos de <i>L. monocytogenes</i>	6
4.1.6 Incidencia de Listeriosis.....	7
4.1.7 Datos de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso en Colombia y factores de contaminación	10
4.1.8 Mecanismos de virulencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	10
4.1.9 Métodos de detección para <i>Listeria monocytogenes</i>	12
4.1.10 Inhibición de <i>Listeria monocytogenes</i>	14
4.2.1 Parte 2: Optimización y validación de métodos analíticos cualitativos.....	16
4.2.2 Validación de métodos cualitativos	16
4.2.3 Fases de la validación.....	16
5. METODOLOGÍA	20
5.1 Búsqueda bibliográfica en bases de datos	20
5.2 Tipo de estudio.....	21
5.3 Población.....	21
5.4 Procedimiento toma de muestras.....	22
5.5 Método de detección horizontal de <i>Listeria monocytogenes</i>	22

5.5.2 Enriquecimiento selectivo primario	22
5.5.3 Enriquecimiento selectivo secundario.....	23
5.5.4 Aislamiento e identificación.....	23
5.6 Confirmación de <i>Listeria spp.</i>	24
5.6.1 Selección de colonias para su confirmación.....	24
5.6.2 Reacción de la catalasa.....	24
5.6.3 Tinción de Gram.....	24
5.6.4 Prueba de motilidad.....	24
5.7 Confirmación de <i>L. monocytogenes</i>	25
5.7.1 Ensayo de hemólisis	25
5.7.2 Utilización de carbohidratos.....	25
5.8 Matriz de control de calidad para análisis en el laboratorio.....	26
5.9 Optimización del método	26
5.10 Análisis de datos	27
6. CONSIDERACIONES FINALES	31
7. BIBLIOGRAFÍA.....	32
8. CRONOGRAMA	38
9. ANEXOS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1.** DIAGRAMA DEL PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN QUESO. (TOMADO Y MODIFICADO DE LA NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC 4666:1999)¹² 13
- FIGURA 2.** RESULTADOS DE BÚSQUEDA EN LAS DIFERENTES PÁGINAS WEB CON LAS QUE CUENTA LA BIBLIOTECA VIRTUAL DE LA UNIVERSIDAD LIBRE. A: BÚSQUEDA EN LA BASE DE DATOS PROQUEST CON EL OPERADOR BOOLEANO AND Y LAS PALABRAS DE INTERÉS: *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND CHEESE. B: RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA EN EBSCO CON LAS PALABRAS: *LISTERIA MONOCYTOGENES*, A FOOD-BORNE PATHOGEN. C: BÚSQUEDA DE LAS NORMAS TÉCNICAS COLOMBIANAS REFERENCIADAS EN EL DOCUMENTO. D: RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA EN SCIENCE DIRECT EN ARTÍCULOS QUE CONTUVIERAN LAS PALABRAS *LISTERIA MONOCYTOGENES* Y CHEESE EN EL TÍTULO Y PALABRAS CLAVE..... 20
- FIGURA 3.** BUSCA BIBLIOGRÁFICA EN BASES DE DATOS ESPECIALIZADAS. A: BÚSQUEDA EN GOOGLE ACADÉMICO DE ARTÍCULOS REFERENTES A *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN QUESO FRESCO. B: BÚSQUEDA EN NATURE DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND CHEESE. C: RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* AND CHEESE EN TEXTOS COMPLETOS GRATIS DENTRO DE LA BASE DE DATOS DE DIVULGACIÓN CIENTÍFICA PUBMED..... 21

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: REACCIONES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE <i>LISTERIA</i> SPP.....	26
TABLA 2. AJUSTES REALIZADOS AL MÉTODO DE DETECCIÓN DE <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> DESCRITO EN LA NTC 4666:1999. PARÁMETROS QUE SE EVALUARÁN PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO CUALITATIVO ALTERNO.	27
TABLA 3. MATRIZ DE REGISTRO DE CONTROL DE CALIDAD ESTÁNDAR PARA EL ANÁLISIS EN EL LABORATORIO.	29

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN MATERIAL DE VIDRIO	39
ANEXO 2. POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN ANALISTA	40
ANEXO 3. POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL AMBIENTE	41
ANEXO 4. POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE SUPERFICIES	42
ANEXO 5. POES LIMPIEZA DEL AUTOCLAVE.....	43
ANEXO 6. POES LIMPIEZA DE LA INCUBADORA.....	44
ANEXO 7. POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LA CABINA DE FLUJO LAMINAR....	45
ANEXO 8. POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LA NEVERA.....	46
ANEXO 9. POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE RECIPIENTES DE AGUA DESTILADA	47

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: Desde el punto de vista microbiológico el queso debe considerarse como un medio de cultivo en donde se están multiplicando algunos microorganismos. *Listeria monocytogenes* es uno de los microorganismos patógenos que se puede encontrar en el queso, el cual ha sido intensamente estudiado ya que representa un riesgo para la salud del consumidor y una gran preocupación en la industria láctea. *L. monocytogenes* es el agente etiológico de la listeriosis humana, una enfermedad transmitida por alimentos que representa un problema importante en la salud pública. Existen 13 serotipos para esta bacteria, de los cuales el serotipo 4b se ha identificado como el que produce más brotes de listeriosis en humanos a través de los alimentos, la cual puede presentarse de forma invasiva y no invasiva. En Colombia son muy pocos los reportes de casos y brotes de listeriosis, debido a que no es una enfermedad de notificación obligatoria. Posteriormente se menciona el método de detección según la norma NTC 4666:1999 y los adelantos en la utilización de bacteriocinas para la inhibición de *L. monocytogenes* en quesos.

OBJETIVO: Este proyecto es un enfoque para la caracterización de *L. monocytogenes* en quesos frescos producidos a pequeña escala, y el propósito principal es establecer los parámetros óptimos para validar cualitativamente el método alternativo en la detección de este microorganismo basado en la NTC 5014:2001. **METODOLOGÍA:** Se recopiló el contenido bibliográfico de las bases de datos con las que cuenta la Universidad Libre como: ProQuest, Science Direct, ICONTEC, EBSCO y E-libro, además otras como NATURE, National Center of Biotechnology Information y Google Académico. El planteamiento de la optimización del método alternativo se basó en los parámetros estándar de la NTC 4666:1999 para la detección de *L. monocytogenes*, se evaluaron las diferentes opciones de medios de cultivo que dicta la norma con tres condiciones diferentes de temperatura y tiempo de incubación (una inferior, la estándar y otra superior) en un total de 30 muestras de queso por triplicado, se realizará un análisis de varianza ANOVA por medio del paquete estadístico STATGRAPHICS. **RESULTADOS:** Los datos más óptimos para la detección de *L. monocytogenes* servirían de base para la creación de un método alternativo, el cual servirá para la validación cualitativa de acuerdo con la NTC 5014:2001 donde se evaluará: la exactitud relativa (AC), desviación positiva (PD), desviación negativa (ND), sensibilidad relativa (SE) y especificidad relativa (SP).

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, queso fresco, optimización, validación de métodos cualitativos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen un problema de salud pública que puede afectar a toda la población y generar años de vida perdidos, donde diversos agentes biológicos, físicos y químicos pueden estar potencialmente involucrados¹.

La leche bovina es un alimento cuya composición varía en función de la raza, alimentación, edad, período de lactación, época del año y sistema de ordeño, entre otros factores. Su principal componente es el agua, seguido por grasa, proteínas e hidratos de carbono. Además contiene, moderadas cantidades de vitaminas (A, D, y vitaminas del complejo B, especialmente B1, B2, B6 y B12) y minerales (fósforo, calcio, zinc y magnesio). Por lo tanto, éste es un alimento con un alto valor nutricional².

La obtención de la leche cruda está reglamentada por el Decreto 616:2006³ y los requisitos de comercialización en el territorio nacional para consumo humano directo están estipulados por el Decreto 1880 del 27 de mayo de 2011⁴. Dentro de los peligros más relevantes que se encuentran en la leche, están los microorganismos patógenos, las toxinas, las sustancias químicas como pesticidas, antibióticos, metales pesados, detergentes, desinfectantes y partículas extrañas, las cuales pueden causar alteración microbiológica y físico-química en este producto. Bacterias tales como *Listeria monocytogenes* ha sido asociada a alimentos tales como leche cruda y pasteurizada, quesos (particularmente variedades blandos-maduros), helados y productos cárnicos, afectando principalmente a niños, ancianos, mujeres gestantes y personas inmunosuprimidas, ocasionando abortos, meningitis o meningoencefalitis⁴.

En el periodo de 1994-1995 el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) realizó un estudio para la determinación e identificación de *L. monocytogenes* en quesos que se comercializaban en Bogotá donde cuyo resultado evidenció, en quesos frescos, una prevalencia del 26.6%. En el Informe de Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos de 2010 del Instituto Nacional de Salud se reportaron 147 brotes (16,5%) asociados al consumo de queso, donde los microorganismos implicados fueron *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes* y *Shigella* spp⁵.

En el 2009, el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) reportó un caso con manifestaciones de meningitis en un niño de 9 años debido al consumo de queso fresco⁶.

Debido a lo anterior se ve la necesidad de detectar oportunamente el agente etiológico causante de esta enfermedad y validar las técnicas de detección cualitativas del microorganismo patógeno en quesos frescos altamente virulento como lo es *Listeria monocytogenes* por medio de vigilancia y control en pro de la seguridad alimentaria de los risaraldenses, siendo este un alimento básico de la canasta familiar.

2. JUSTIFICACIÓN

Todas las cepas de *L. monocytogenes* se consideran patógenas, aunque su virulencia es variable y las manifestaciones clínicas dependerán del estado inmunológico de cada individuo⁷. En los países industrializados, como Estados Unidos, en donde la listeriosis es de notificación obligatoria en todos los estados desde el 2001, se reportan 2.500 casos anuales de listeriosis ocasionados por alimentos en los cuales muere una de cada cinco personas afectadas⁸. El Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) reportan 20 muertes por cada 100 casos de listeriosis por año y consideran esta enfermedad como un importante problema de salud pública. Los países pertenecientes a la Unión Europea reportan una incidencia de 2 a 10 casos de listeriosis por millón de personas⁹.

En Colombia, los reportes de listeriosis son muy escasos; se notificaron al Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) las enfermedades transmitidas por alimentos ocasionadas hasta la semana epidemiológica número 16 de 2010, el cual informó cuatro brotes de listeriosis. Aunque *L. monocytogenes* no es un microorganismo de notificación obligatoria, podría serlo en un futuro si se fortalece la vigilancia de dichas enfermedades¹⁰, por tal motivo, es de gran importancia contribuir a la detección de este microorganismo en un alimento común, como el queso fresco, el cual representa una alta fuente de nutrición para la población, de allí radica la importancia de establecer la validación cualitativa del método analítico, donde se realiza principalmente para demostrar la credibilidad de un proceso importante dentro de un estudio de laboratorio. Además de la capacidad de tal método de satisfacer los requisitos para la aplicación analítica deseada, recoge aspectos de ética, aseguramiento de la calidad, enfoque económico y regulatorio¹¹. De allí que se implementará una optimización del método de detección que se va a desarrollar en este estudio basado en la Norma Técnica Colombiana 4666:1999¹²: “Método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*” y la Norma Técnica Colombiana 5014:2000¹³ para ejecutar la validación cualitativa del método obtenido por la optimización.

La evaluación de riesgo durante el proceso de producción del queso, permitirá adoptar medidas preventivas para evitar la contaminación por *L. monocytogenes*, además permitirá orientar las acciones de inspección, vigilancia y control, utilizando los recursos de manera eficiente y protegiendo de esta manera la salud pública, reduciendo el riesgo de ETA¹⁴.

3. OBJETIVO GENERAL

Optimizar los parámetros descritos en el método de detección de *Listeria monocytogenes* en queso fresco fundamentado en la NTC 4666:1999 para desarrollar un método alternativo y establecer una validación cualitativa de dicho método.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer parámetros a optimizar teniendo como base estándar los plasmados en la NTC 4666:1999.
- Elaborar matriz de control y calidad dentro del laboratorio para la realización de la optimización.
- Analizar e interpretar la varianza ANOVA de los datos por medio del paquete estadístico STATGRAPHICS.
- Desarrollar el método alternativo de detección específico para identificar la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos según los datos óptimos de crecimiento.
- Validar de manera cualitativa el método alternativo obtenido de acuerdo a la NTC 5014:2001.

4. MARCO TEÓRICO

4.1.1 Parte 1: Caracterización de *Listeria monocytogenes*

La canasta básica alimentaria (CBA) se define como el conjunto de alimentos expresados que representa un mínimo alimentario a partir de un patrón de consumo de hogares promedios. Los lácteos son uno de los principales alimentos de la CBA, los cuales incluyen alimentos como la leche y sus derivados procesados (generalmente fermentados)¹⁵. La industria lactológica debe cumplir en todo momento las normas de higiene pública, lo que se consigue mediante comprobaciones regulares de la calidad la cual comprende muchos factores tanto físicos como químicos, biológicos, tecnológicos, económicos, y estéticos para poder suplir las necesidades del público en general¹⁶.

El queso, un alimento derivado lácteo rico en calcio, proteínas y fósforo con un contenido de grasa que varía según su clase, es un alimento preparado con materiales biológicos (leche, cuajo y microorganismos); sus características finales dependen en gran parte de las condiciones en que se producen y almacenan, y para lograrlas se requiere de un período madurativo más o menos largo.

Hace miles de años (322 a. C), los métodos de fabricación del queso empezaron siendo simples pero evolucionaron gradualmente desde la formación de la cuajada por fermentación natural hasta una producción controlada mediante la que se fabrica una forma de cuajada que pueda conservarse. Se desarrollaron diversas formas de fabricar el queso que dependían de la experiencia y las demandas locales y comerciales donde posteriormente adquirieron gran importancia a nivel local, nacional e internacional. Actualmente, existen más de 400 variedades de queso naturales que se fabrican con leche y se dividen en tres tipos principales: blandos, de vena azul y quesos duros. Estos pueden variar en su relación con su contenido de humedad y por lo tanto en lo referente a su vida útil y método de maduración¹⁶.

4.1.2 Producción del queso fresco a pequeña escala

El queso fresco definido por la Resolución 2310 de 1986 del Ministerio de Salud “es un producto higienizado sin madurar, que después de su maduración está listo para el consumo”¹⁷. La elaboración de este tipo de queso se obtiene separando los componentes sólidos de la leche (cuajada) de los líquidos (suero); cuanto más suero se extrae más compacto resulta el producto final. El primer paso del proceso consiste en dejar reposar la leche en un sitio cálido de manera tal que la lactosa se fermenta por acción de las bacterias ácido-lácticas, lo que logra la separación de la caseína del suero. Para la aceleración del proceso se hace utilidad de una enzima denominada renina presente en el cuajo, la cual promueve una mayor pérdida de agua y aumenta la firmeza; posteriormente se hace un colado para lograr la expulsión del suero mediante la agitación e incrementa la superficie de contacto. El siguiente paso consiste en agregar cloruro sódico para evitar el crecimiento de bacterias no deseables contra el crecimiento de microorganismos deseables, colabora con cambios fisicoquímicos de la cuajada y potencia el sabor del queso; luego se vierte en moldes para darles forma, donde se dejan en reposo durante algunas horas para ser empacados y distribuidos. No se le realiza un proceso de maduración por días, es por esto que se denomina queso fresco^{16,18,19,20}.

La fabricación de la gran parte de los quesos frescos se elabora a partir de leche cruda lo que constituye un riesgo de contaminación ya que en estos establecimientos de producción a pequeña escala, la leche proviene de granjas con diferentes condiciones de manejo^{19,21}, donde no son conocidas las prácticas de higiene de quién realiza el ordeño, las prácticas de manufactura, las condiciones del lugar de fabricación o el estado de salud del animal por medio de las guías de inspección veterinaria²².

4.1.3 Microbiología del queso

Desde el punto de vista microbiológico el queso debe considerarse como medio de cultivo sólido en donde se están multiplicando algunos microorganismos: bacterias lácticas, micrococos, mohos y levaduras. Las bacterias ácido lácticas son las responsables de la fermentación en alimentos, específicamente en quesos donde convierten la lactosa en ácido láctico, entre sus géneros más conocidos se encuentran los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, entre otros²³. Los micrococos son bacterias de un papel beneficioso en el queso por sus propiedades proteolíticas, lipolíticas y esterolíticas, además algunos de sus metabolitos están siendo estudiados para la aceleración de la maduración²⁴. En cuanto a las levaduras se encuentran en la mayoría de los quesos, y aunque no se conoce el rol que desempeñan en la maduración, se sabe que contribuyen a un desarrollo positivo del sabor y la textura.^{25,26} La composición del queso, nutrientes, valores de actividad acuosa y pH, lo convierte en un alimento de alto riesgo en salud pública susceptible a altas contaminaciones²², además como se describió anteriormente, el procesamiento de los quesos frescos es mínimo antes de su empaquetado, lo que los hace perecederos reduciendo su vida útil, incluso a temperatura de refrigeración^{27,28}.

La mayoría de los microorganismos patógenos en el queso incluyen grupos de cepas de *Staphylococcus aureus*²⁹, *Streptococcus spp*¹⁸, *Salmonella spp*³⁰, *Escherichia coli*³¹, *Campylobacter spp*³², *Yersinia enterocolitica*³³, *Bacillus cereus*³⁴ y en algunos países *Brucella spp*³⁵ y *Mycobacterium bovis*³⁶. *Listeria monocytogenes* es otro microorganismo que se encuentra incluido en estos grupos de patógenos que afectan al queso, el cual ha sido intensamente estudiado ya que representa un riesgo para la salud del consumidor; en Colombia este patógeno no es de notificación obligatoria, para tal efecto, es el microorganismo de interés en particular para esta revisión.

4.1.4 *Listeria monocytogenes*

Hace algunos años se conocían 6 especies del género *Listeria* (*L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, y *L. grayi*)^{19,22,37,38,39,40}, pero actualmente se han descrito dos nuevas especies (*Listeria marthii* y *Listeria rocourtiae*)^{41,42,43}, de las cuales únicamente *Listeria monocytogenes* es patógena en humanos y *Listeria innocua* es patógena en animales.

Listeria monocytogenes, fue descrita por primera vez por Murray et al⁴⁴, los cuales la nombraron *monocytogenes* debido a una monocitosis característica encontrada que infectaba conejos de laboratorio. Su nombre fue cambiado por *Listerella hepatolytica* en 1927 por Pirie y se le dio el nombre actual por él mismo en 1940⁴⁴.

L. monocytogenes pertenece al orden *Firmicutes* de la familia de los *lactobacilaceae*;⁴² es un bacilo Gram positivo, oportunista, intracelular, no formador de esporas, anaerobio facultativo, catalasa positivo y oxidasa negativo, posee un cromosoma de 2.944.528pb con un promedio bajo de G+C de

39%^{39,45,46,47}, es una varilla que crece a bajas temperaturas de refrigeración entre -0.4 y 50°C, con un crecimiento óptimo entre 30 y 37°C, móvil a 25°C e inmóvil a 37°C^{27,40,43,44} por lo cual es una bacteria psicrófila, capaz de reproducirse y sobrevivir a un amplio rango de temperatura lo que, en consecuencia, hace de *L. monocytogenes* un microorganismo de transmisión alimentaria de gran preocupación para la industria láctea y en general, para la salud pública a nivel mundial^{27,37,48,49,50,51}. Este microorganismo expresa una β hemolisina de *Staphylococcus aureus* en eritrocitos de oveja; posee flagelos peritricos y las características de las colonias se presentan por un brillo verde-azul por la luz transmitida de forma oblicua²⁰. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza como en el agua, suelo, vegetación, en desperdicios animales, en el ensilaje e incluso en los mismos animales, ya sea por la contaminación directa la cual se debe a las enfermedades que posea el animal o indirecta debido a la falta de higiene del ordeñador por contacto con las heces^{46,47,52}; ha sido aislada de diversos alimentos tales como leche, carne, queso en diferentes países⁴⁸. Además de resistir a diversas condiciones de temperatura y ambiente, se ha descrito que *Listeria monocytogenes*, también es resistente a rangos de pH desde 4.4 hasta 9.4⁴⁰, a altas concentraciones de sal (10%)^{21,45}, y a rangos de actividad acuosa superiores a 0.92¹⁹. Como se describe, *L. monocytogenes* es uno de los microorganismos más resistentes a diversas condiciones ambientales que muchas otras bacterias patógenas no esporuladas transmitidas por alimentos, lo que le permite sobrevivir a condiciones adversas durante mucho más tiempo⁵². Otra característica que representa a *L. monocytogenes*, es su capacidad para producir biopelículas^{19,40,45,53}, lo que dificulta en gran medida su eliminación por presentar resistencia a diferentes desinfectantes⁵⁴.

4.1.5 Serotipos de *L. monocytogenes*

Existen 13 serotipos (antígenos de su superficie celular que clasifican al microorganismo como infeccioso) para esta bacteria 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7^{38,45}. En cuanto a los serotipos circulantes en Colombia, son pocos los registros oficiales ya que la única entidad que realiza la serotipificación es el Laboratorio Nacional de Referencia INVIMA, de muestras procedentes del laboratorio de la Red Nacional de Salud Pública. En el período comprendido entre 2000 y 2003, se serotipificaron un total de 294 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos, donde se encontró que el serotipo 4b fue predominante: 1/2a (2.04%), 1/2b (7.14%), 1/2c (6.46%), 3a (0.34%), 3b (2.38%), 4a (0.34%), 4b (73.81%), 4c (1.70%), 4d-4c (5.78%)¹⁹.

En estudios previos de la estructura filogenética de *Listeria monocytogenes* se dan a conocer tres divisiones genéticas, las cuales se clasifican en tres linajes: linaje I contiene serotipos 4b, 1/2b, 3b, 4d, 4e y 7 (incluye todas las cepas epidémicas de brotes de listeriosis humanas clínicas y transmitidas por alimentos); el linaje II, serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c (contiene aislamientos de casos humanos); y el linaje III incluye tres grupos, IIIA, IIIB y IIIC y los serotipos 4a, 4c y 4b (asociados con aislamientos de animales)⁴¹. En general, se describe que los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b son los mayormente implicados en la listeriosis, sin embargo las caracterizaciones genotípicas y fenotípicas relacionadas sugieren que el serotipo 4b aislado ha sido el responsable de los más importantes brotes de listeriosis humanas transmitidas por alimentos³⁹.

4.1.6 Incidencia de Listeriosis

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) constituyen un problema de salud pública que puede afectar a toda la población y generar años de vida potencialmente perdidos, donde diversos agentes biológicos, físicos y químicos pueden estar potencialmente involucrados^{19,27,47}. Es así como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (Food and Agriculture Organization, FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) están preocupadas por el aumento en la incidencia de estas enfermedades en las últimas décadas. Se desconoce si es el resultado de una mejor vigilancia y utilización de metodologías con una mejor caracterización de los peligros⁴⁵. A pesar de la utilización de tecnologías modernas en la producción de alimentos y la implementación de normas de calidad, las intoxicaciones alimentarias son la causa de 6.5 a 33 millones de enfermedades humanas y más de 9.000 muertos / año en el mundo²³. El aumento de la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos que se ha producido en las últimas décadas está al parecer relacionado, en muchos países, con un aumento de las enfermedades ocasionadas por la presencia de microorganismos en los alimentos^{21,38,40}.

Listeria monocytogenes es el agente etiológico de la listeriosis humana, una enfermedad transmitida por alimentos que representa un problema importante en la salud pública^{21,40,41}. Es una enfermedad poco frecuente pero grave que afecta al hombre y a los animales, se reveló como un fenómeno de gran interés a partir de la década del ochenta del siglo XX, donde se comenzaron a apreciar diversos episodios asociados a la alimentación. Su incidencia es diferente de un país a otro y se presenta tanto en forma epidémica como esporádica^{19,27,44,53}. Cuenta con un prolongado período de incubación y sus manifestaciones clínicas son muy variadas, por lo que se dificulta el diagnóstico y se eleva su letalidad^{52,55}. Las manifestaciones principales de la listeriosis incluyen meningitis, aborto espontáneo y septicemia, peritonitis, también se han reportado formación local de abscesos, endocarditis, uretritis, endoftalmis, conjuntivitis, hepatitis, artritis y lesiones cutáneas^{44,47,55,56,57}. *L. monocytogenes* es un patógeno veterinario con significativa causando septicemia, infección del sistema nervioso central (SNC), o el aborto en una amplia gama de especies de animales domésticos incluyendo aves de corral, primates, gatos, cerdos, caballos, y más prominente vacas y ovejas. Se trata de las dos últimas especies que presentan la mayor preocupación veterinaria y representan la mayor amenaza zoonótica, principalmente como resultado de contaminación por *L. monocytogenes* en leche y carne^{22,44,49}.

Listeriosis producida por el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* puede ser de dos tipos: invasiva y no invasiva. Adicionalmente, la infección en humanos puede ser de tipo ocupacional (ejemplo: ordeñadores, médicos veterinarios y zootecnistas). Los mayores grupos de riesgo de Listeriosis son mujeres embarazadas, personas mayores de 65 años, neonatos (hasta 4 semanas) y pacientes con alguna deficiencia inmunológica (pacientes trasplantados, con leucemia, portadores de VIH, diálisis, pacientes con cáncer, enfermedades hepáticas, diabetes, alcoholismo) que pueden llegar al 20% de la población total^{19,47,48,55}. La listeriosis no invasiva se manifiesta por síntomas de gastroenteritis, como diarrea, fiebre, cefalea y mialgias, y su periodo de incubación es corto^{41,58}. La listeriosis invasiva se produce cuando la infección ocasionada por las células bacterianas atraviesa la barrera intestinal y alcanza sistemas y órganos que son blanco de infección, como son el sistema nervioso central y el útero en la mujer embarazada^{21,45,55}.

La probabilidad de enfermar por el consumo de un número especificado de bacterias *L. monocytogenes* puede representarse de forma conveniente mediante el triángulo epidemiológico, compuesto por los siguientes factores, todos importantes: la matriz alimenticia, la virulencia de la cepa y la vulnerabilidad del consumidor³⁸. Influencia de la matriz de alimento: En el caso del queso, los glóbulos de grasa de la leche pueden favorecer la sobrevivencia de *L. monocytogenes*. La virulencia del microorganismo: se estima que entre el 1-10% de las cepas de *L. monocytogenes* son virulentas. La susceptibilidad del hospedero: Hay diferencias sustanciales en susceptibilidad entre las poblaciones de bajo y alto riesgo. La dosis para grupos de riesgo se estima en 103 UFC/g y en 107 UFC/g para población normal¹⁹.

Los antecedentes epidemiológicos de listeriosis muestran que se informa de casos esporádicos así como brotes de listeriosis invasiva, con una frecuencia de 3 a 8 casos por 1.000.000 habitantes. Se le considera por lo tanto una ETA de baja frecuencia pero de alta mortalidad, causando la muerte de un 20 a 30% de las personas infectadas^{22,38,40}. A pesar de presentarse con una baja frecuencia, en la actualidad es una de las ETAs más letales conocidas, causando gran alarma a nivel mundial a productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias^{22,44}. Esta preocupación a través de los años ha ido en aumento, ya que tanto investigadores como autoridades de salud han llegado a la conclusión que no es posible su completa eliminación a nivel de las plantas procesadoras de alimentos, por lo cual deberán extremarse las medidas para su control tanto a nivel industrial y comercial como también en el hogar^{40,44,52}.

Los cuadros de listeriosis, brotes esporádicos y epidemias han tenido como vehículo una gran variedad de alimento; entre ellos la leche, el queso, la mantequilla, el paté, la carne de res, la carne de cerdo, las aves, los vegetales, los productos del mar y particularmente los productos listos para consumo rápido destacándose los productos listos para consumir^{22,44,55} que soportan el crecimiento de esta bacteria, tienen un tiempo de conservación prolongado en condiciones de refrigeración y se consumen sin tratamiento^{37,43,47,53}.

En las últimas décadas, en el ámbito mundial, el queso fresco ha sido el principal alimento involucrado en brotes de Listeriosis^{19,27,44,55}, debido a que es elaborado a partir de leche cruda sin pasteurización, inadecuadas prácticas de manufactura, que sumados a la alta humedad y al hecho de no estar sujetos a controles de almacenamiento, distribución y expendio, se convierten en un vehículo potencial de transmisión para *L. monocytogenes*^{21,37}.

En 1985 el consumo de queso contaminado marca Jalisco estilo mexicano (queso blanco) fabricado en California estaba directamente vinculado a más de 142 casos de listeriosis, incluyendo 48 muertes^{27,44,57}.

El Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) reportó uno de los brotes de mayor impacto por *L. monocytogenes* en el año 2000¹⁶, debido al consumo de queso fresco tipo mexicano, elaborado de forma artesanal con leche cruda contaminada. En este brote se reportaron 12 casos, 11 mujeres con edad promedio de 21 años y un hombre de 70 años que desarrolló un absceso cerebral. Del total de mujeres 10 estaban embarazadas, de ellas 5 abortaron, 3 tuvieron parto prematuro y en dos casos, se presentaron infecciones en los neonatos. La tasa de hospitalización fue del 100%. En este brote se puede observar que los afectados concuerdan con los grupos de riesgo reportados para la enfermedad⁴⁴. Es importante resaltar que, considerando los hábitos de consumo de las mujeres embarazadas, éstas consumían 2 y 3 porciones por día,

aumentando el riesgo de exposición^{19,55}. Estados Unidos, en donde la listeriosis es de notificación obligatoria en todos los estados desde el 2001, se reportan 2.500 casos anuales de listeriosis ocasionados por alimentos y muere una de cada cinco personas afectadas^{41,45}.

La Regulación de la Unión Europea 2073/2005 modificado por el Reglamento 1441/2007 sobre los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios ha puesto criterios estrictos en productos listos para el consumo que son capaces de llevar el crecimiento de *Listeria*. Estos incluyen muchos alimentos especiales producidos en granjas, como quesos y productos lácteos. La legislación requiere ausencia de *L. monocytogenes* en 5 muestras de 25g (con ninguno positivo) antes de que la comida haya dejado el control inmediato del productor, y menos de 100 UFC/g en los productos comercializados durante su vida útil. La identificación y cuantificación de los factores que limitan el crecimiento de *L. monocytogenes* durante la fabricación de queso, por tanto, son importante para la seguridad de queso^{52,54}.

Según los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que la región latinoamericana experimentó, al menos, 6.000 brotes de diversos tipos de enfermedades de origen alimentario entre 1993 y 2002, los cuales, junto con un número mayor de casos aislados de enfermedades provocadas por los alimentos o agua, causaron en la región unas 57.000 muertes en 2004. Sin embargo, según los expertos, esta estimación se encuentra todavía muy por debajo de la incidencia real del problema^{40,51}.

En Colombia son muy pocos los reportes de casos y brotes de listeriosis, debido a que no es una enfermedad de notificación obligatoria. Desde 1992 se han reportado algunos casos de infección por *L. monocytogenes* y un índice de mortalidad del 26% aunque en la actualidad se habla de subregistros. El factor más alarmante de la listeriosis no es la incidencia, sino la tasa de hospitalización (90%) que supera a la mayoría de los patógenos implicados en enfermedades transmitidas por alimentos²². En el año 2000, se creó la Red Nacional de Vigilancia Microbiológica de *Listeria monocytogenes*, a la cual pertenecen todos los laboratorios de salud pública de los departamentos y del distrito capital del país, siendo obligatorio el envío de sus aislamientos al laboratorio de referencia del INVIMA para su confirmación y serotipificación. En el 2009 se notificaron al Sistema de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) tres brotes. Se detectó *L. monocytogenes* en restos de alimentos consumidos por las personas enfermas. En dos de estos brotes los alimentos implicados fueron comidas preparadas listas para consumir y el tercer brote correspondió al consumo de queso fresco; en este se aisló *L. monocytogenes* tanto de alimentos como del líquido cefalorraquídeo⁴¹.

A nivel regional, Secretaría de Salud alertó en el 2011 sobre dos reportes epidemiológicos generados por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos INVIMA de productos contaminados con *Listeria spp.* de circulación nacional: en primera instancia están los productos de marca Zarpollo, los cuales son salchichas de pollo lote 4361111 y jamón de pollo marcado con el lote 337117. El segundo producto es el lote 3804 del champiñón tajado fabricado por Setas Colombianas S.A, el cual fue distribuido en los departamentos de Antioquia, Bogotá, Boyacá, Cauca, Huila, Nariño, Quindío y Risaralda⁵⁹. Cabe destacar que en el departamento de Risaralda no se han reportado casos de brotes de listeriosis, ni se han encontrado registros de la presencia del mismo en quesos.

4.1.7 Datos de *Listeria monocytogenes* en queso en Colombia y factores de contaminación

Esta bacteria tiene la facultad de sobrevivir a la fabricación y maduración de quesos diferentes, se concentra generalmente en la cuajada y solo una pequeña porción de microorganismos están presentes en el suero⁴⁴. En Colombia, se han realizado estudios de la prevalencia de *L. monocytogenes* en queso, desde el año 2005 hasta el 2009 y se encontró que en el queso blanco en Antioquia de 172 muestras analizadas hubo presencia de *L. monocytogenes* en 57 muestras (33.1%); en cuanto a queso blanco artesanal en Cundinamarca se analizaron 30 muestras de las cuales el 13.3% resultó positiva para este microorganismo⁴⁷; para el queso fresco en el Norte de Santander se analizaron 83 muestras en donde en 5 (6.02%) hubo presencia de la bacteria. Del mismo estudio se establecieron los factores de contaminación de *L. monocytogenes* en la elaboración del queso, donde la primera causa de contaminación es la materia prima dado que la leche contaminada puede contaminar los equipos, otra leche e instalaciones; el agua que utilizan para la preparación del cloruro de sodio no es potable, por ende, puede contener *L. monocytogenes*. En cuanto a las instalaciones se asume que los pisos, drenajes, cuartos fríos, favorecen a la supervivencia de este microorganismo y la posible formación de biopelículas. Los equipos y utensilios no deben ser porosos para no favorecer la persistencia de *L. monocytogenes* y en su medida deben ser de acero inoxidable. El manipulador es otro factor importante y donde se presenta mayor contaminación por los productores de queso fresco a pequeña escala, pues no cuentan con una capacitación permanente de buenas prácticas higiénicas, además, deben contar con un adecuado manejo de tiempos y temperaturas de proceso, la cadena de frío no elimina el microorganismo, pero sí ayuda a que su multiplicación sea más lenta. El proceso inapropiado de pasteurización es el punto de control más importante ya que puede activar las células de *L. monocytogenes* u otros patógenos que sobrevivan; el suero de la leche es otro factor de contaminación y es por eso que se debe realizar un buen colado. En cuanto a la limpieza y desinfección, es un proceso que no se implementa de manera adecuada por parte de los productores, pues la mayoría no cuentan con los agentes quelantes y desinfectantes necesarios, ni con la capacitación de cómo debe establecerse el programa de limpieza y desinfección de superficies, áreas, materias primas, etc¹⁹.

4.1.8 Mecanismos de virulencia de *Listeria monocytogenes*

Se establece que las cepas de *L. monocytogenes* son de virulencia multifactorial, ya que se han encontrado diferencias significativas entre la virulencia de cepas de origen clínico y de alimentos, siendo las primeras las que presentan dosis letales más bajas^{39,44}. Desde finales de 1980, los estudios realizados en biología celular combinado con biología molecular y genómica han elucidado la elegante estrategia utilizada por *L. monocytogenes* para ingresar al hospedero, multiplicarse y propagarse entre célula-célula. Estos estudios identificaron y caracterizaron los factores de virulencia involucrados en el ciclo intracelular además, de los mecanismos de regulación que modulan la virulencia^{60,61}. La patogenia de la infección por este microorganismo es aún es poco comprendida y los datos disponibles han derivado de observaciones hechas en animales de experimentación^{39,60}.

Como se mencionó anteriormente, la susceptibilidad del hospedero juega un papel importante en la presentación de la enfermedad luego de la exposición a *L. monocytogenes*; de esta manera la mayoría de pacientes experimentan un defecto fisiológico o patológico que afecta la inmunidad

mediada por células T, lo que justifica la clasificación de *L. monocytogenes* como un patógeno oportunista³⁹. La patogenicidad de *L. monocytogenes* se debe a la capacidad para adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células no fagocíticas (enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas)^{39,44}. El proceso de infección de este microorganismo comprende varias etapas:

a) Adhesión celular: Es una etapa fundamental para la patogenicidad bacteriana. El ciclo comienza con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la subsecuente penetración de la bacteria dentro de la célula hospedero, *L. monocytogenes* es tomada por las células del hospedero a través de fagocitosis. Se ha descrito la participación de varios factores que permiten establecer un contacto íntimo con las células del hospedero, destacándose las proteínas Lap, Ami, FbpA, LapB e InlJ. Lap es una adhesina que está presente en todas las especies de *Listeria spp*, excepto en *L. grayi*. Ami es una amidasa autocatalítica. FbpA es una proteína de superficie homóloga a las proteínas atípicas de unión a fibronectina. LapB es una proteína necesaria para la adhesión e ingreso en líneas celulares de mamíferos y para la virulencia en roedores infectados intravenosa u oral. Finalmente, la proteína InlJ, que pertenece a la familia de las internalinas, cuya expresión es inducida *in vivo* y actúa como adhesina que se encuentra unida covalentemente al peptidoglicano; esta unión se realiza mediante la enzima sortasa A (SrtA)^{39,60}.

b) Invasión celular: Las dos principales proteínas de invasión de *L. monocytogenes* son InlA y InlB, codificadas por los genes *inlA* e *inlB*, respectivamente. Pertenecen a las internalinas (Inl) y son reconocidas por poseer en su extremo N-terminal una región LRR (Leucine Rich Repeat) y en su extremo C-terminal una secuencia conservada LPXTG (Leu-Pro-X-Thr-Gly). InlA se une de forma covalente al peptidoglicano en cambio InlB se une mediante interacción electrostática a moléculas de ácidos lipoteicoicos permitiendo la adherencia de las bacterias a la célula eucariota y por ende la invasión. Estos dos factores de virulencia, siguen siendo los más importantes en cuanto a la invasión celular a pesar de los otros factores investigados actualmente^{39,42,60}.

c) Sobrevivencia, multiplicación y extensión célula-célula: Una vez que *L. monocytogenes* ha sido fagocitada por un macrófago, en pocas horas se cubre de filamentos de actina. La cubierta de actina se organiza para formar apéndices de actina F, facilitando el desplazamiento de *L. monocytogenes* en el interior del macrófago y la posterior diseminación a macrófagos contiguos. Las condiciones que existen en el fagolisosoma, inducen la secreción de Listeriolisina O (LLO), ésta es una toxina dependiente de colesterol codificada por el gen *hly* y capaz de formar poros en la membrana de los fagosomas, permitiendo que *L. monocytogenes* escape de las vacuolas primarias y secundarias, encontrando el medio favorable para la multiplicación. Luego de la replicación, se induce la polimerización de filamentos de actina en un polo de la bacteria; este proceso es dirigido por la proteína ActA. La formación de una estructura semejante a una cola de cometa facilita el movimiento intracelular, permitiendo la invasión a células vecinas, mediante un proceso que implica la formación de una protrusión que contiene a la bacteria rodeada por una vacuola de doble membrana, la cual es lisada por PC-PLC, PI- PLC y LLO^{39,42,60}.

Hemolisinas

Estas hemolisinas de *L. monocytogenes* son otro factor de virulencia de gran importancia, este gen no solamente fue el primer factor de virulencia de *Listeria* identificado sino, también, el primer gen bacteriano capaz de sintetizar productos que permiten la supervivencia de bacterias en el interior de

las células eucariotas del hospedador. La identificación del gen *hly* permitió rápidamente su localización en el genoma de *L.monocytogenes* y la caracterización genética de los genes próximos en un fragmento genético de 9,4 kb asociado a la virulencia de *L. monocytogenes* y con funciones esenciales para su supervivencia intracelular. Se realizaron estudios de mutagénesis de transposones para preparar mutantes de *hly* y la investigación a fondo que permitió la identificación de más factores de virulencia hasta llegar a los que existen actualmente^{44,61}.

4.1.9 Métodos de detección para *Listeria monocytogenes*

La NTC 4092:2009 define un método de detección como aquel que determina la presencia o ausencia de microorganismos particulares en una cantidad determinada de producto⁶².

En la actualidad existen varios métodos convencionales y rápidos disponibles para la detección e identificación de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos^{63,64,65}. Son pocas las empresas que realizan pruebas específicas y de alta confiabilidad como lo son las pruebas de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual es una técnica rápida y sensible que permite detectar determinado patógeno en materiales crudos y productos procesados^{63,65,66}, sin embargo es una técnica que tiene altos costos de equipamiento lo cual no es conveniente para las industrias de alimentos, por tal motivo recurren a los métodos microbiológicos convencionales ya que estos tienen una alta sensibilidad de la técnica donde no se requiere de equipos de alto costo y sofisticados⁶⁷, además su empleo permite la obtención del microorganismo en cultivo puro, lo cual es útil para los procesos reglamentarios⁶⁴, a pesar de que el periodo de tiempo es relativamente largo ya que se necesitan 5 días para la identificación de *Listeria spp* y 10 días más para confirmar *L. monocytogenes*, es un método ampliamente utilizado en las industrias alimentarias^{63,65,66}.

La detección de *Listeria monocytogenes* se define como la presencia o ausencia de este microorganismo en una cantidad, peso o volumen, dado de producto, cuando se realizan los ensayos según la norma NTC 4666:1999¹², este microorganismo puede estar presente en número pequeño y es muy frecuente que se encuentre acompañado de un mayor número de otros microorganismos, siendo necesario un enriquecimiento selectivo⁷⁰. Con el fin de facilitar la recuperación de estos microorganismos en los alimentos, usualmente se realiza un pre-enriquecimiento en un caldo no selectivo seguido de enriquecimiento selectivo y aislado sobre un medio de agar selectivo/diferencial. El uso de dos caldos de enriquecimiento diferentes, así como dos o más medios de agar selectivos, incrementa la sensibilidad del método⁶².

En el marco de la norma NTC 4666:1999¹², la detección de *L. monocytogenes* debe efectuarse en cuatro etapas sucesivas como se encuentra en la Figura 1; diversos autores han empleado el mismo método de detección para *L. monocytogenes* en quesos^{47,65,69,70,71,72}.

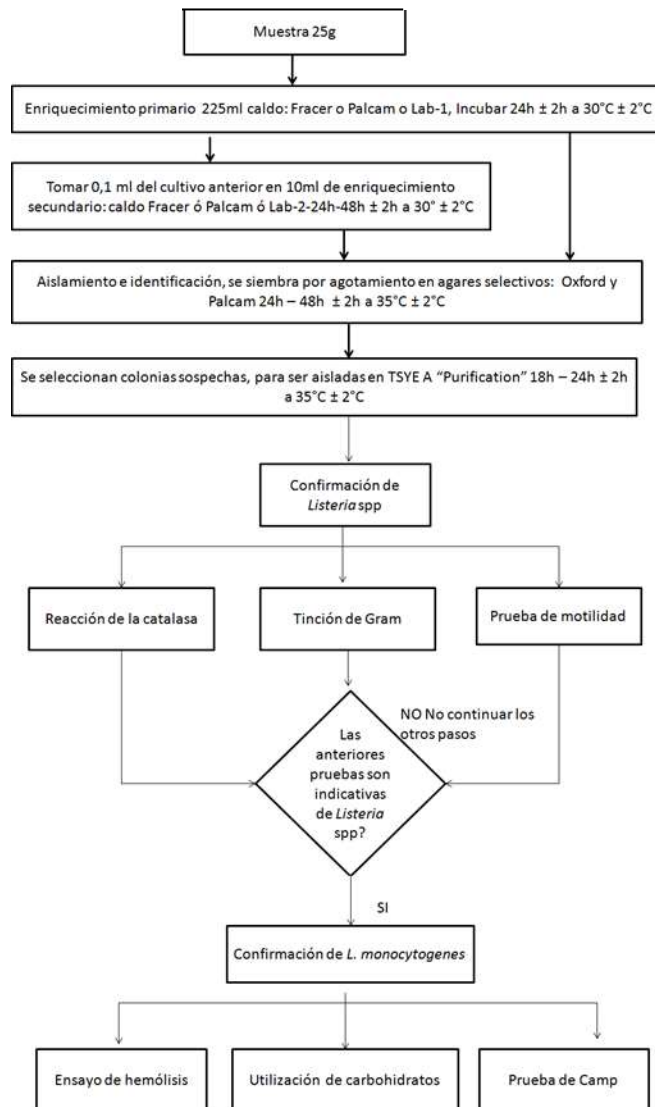


Figura 1. Diagrama del procedimiento de detección de *Listeria monocytogenes* en queso. (Tomado y modificado de la Norma Técnica Colombiana NTC 4666:1999)¹²

4.1.10 Inhibición de *Listeria monocytogenes*

La conservación de alimentos y la calidad microbiológica representan las principales preocupaciones y desafíos para la industria alimentaria²⁸. La fermentación bacteriana de materias primas perecederas se ha utilizado durante siglos para preservar el valor nutritivo de los alimentos y bebidas a través de una vida útil más larga. En un número de fermentaciones de alimentos, el evento clave es la conversión de azúcares en ácido láctico por las Bacterias Ácido Lácticas (LAB, que incluyen los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y, entre otros)^{23,50}. Estas bacterias se encuentran entre los productores más conocidos e investigados de antagonistas microbianos. Su papel en la preservación de las características y el sabor de los alimentos ha sido bien documentado, son de uso generalizado en las industrias alimenticias, especialmente la láctica y procesamiento de cárnicos fermentados²³.

La capacidad de un agente antimicrobiano para suprimir efectivamente el crecimiento o la formación de la toxina microbiana depende de una amplia gama de propiedades físicas, químicas, y factores biológicos, que incluyen variables tales como la temperatura, la acidez, la actividad de agua, y los tipos de microorganismos diana³⁷.

La nisina es un miembro de un grupo de sustancias antibacterianas potentes llamadas bacteriocinas^{23,27,28,37}. Las bacteriocinas son macromoléculas que contienen proteínas que ejercen un modo de acción bactericida contra las bacterias susceptibles. La nisina, su nombre deriva de grupo N sustancia inhibidora, fue reconocida por primera vez por Rogers y Whittier, quienes inicialmente la caracterizaron como inhibidora. La aplicación de la nisina como conservante de alimentos se evaluó primero en queso suizo en el que se evitó eficazmente el soplado (gaseado) atribuido al crecimiento de clostridia. Posteriormente, el uso de la nisina como conservante se investigó en una gran variedad de alimentos frescos y procesados, incluyendo el jugo de tomate, maíz estilo crema, carne líquida, y, más recientemente, en la cerveza y el vino. La nisina es eficiente en la inhibición de ciertas especies Gram-positivos, incluyendo formadores de esporas (*Clostridium botulinum*), pero no bacterias Gram-negativas, levaduras u hongos^{23,27,37}.

A lo largo de las investigaciones se ha sugerido la adición de nisina a la leche en la producción de quesos^{23,27,28,37} suaves, blancos, frescos hechos sin cultivos iniciadores (normalmente acidificadas o coagulado con cuajo), como el requesón, panir y quesos latinoamericanos blancos y frescos, podrían controlar efectivamente la contaminación con el patógeno *L. monocytogenes* y extender la vida útil del producto^{27,50}.

En una investigación realizada por Dong-Sun et al. En el departamento de Ciencia y Tecnología en la Universidad del Estado de Oregon (1992), se evaluó la efectividad de la actividad inhibitoria de la nisina contra *Listeria monocytogenes* en leche líquida y la influencia de la grasa y los emulsionantes. Los ensayos de actividad biológica utilizaron un indicador el cual indicó la actividad inicial de la nisina (50 U/ml). La actividad de nisina disminuyó en ca. 50% de la leche que contenía 1,29% de grasa. Leches que contenían 0, 10, o 50 U/ml de nisina y diferentes porcentajes de grasa fueron inoculados con aproximadamente 7 a 7,5 log₁₀ ufc/ml de la fase de registro de *Listeria monocytogenes* Scott A o Jalisco. Después de 2 horas de inoculación, el recuento viable de *L. monocytogenes* Scott A decreció a log₁₀ 0.30 ufc/ml en leche descremada con 50 U/ml de nisina, con 10 U/ml de nisina decreció log₁₀ 2.90 ufc/ml en leche descremada, y aumento un poco (log₁₀ 7.8 ufc/ml) en leche descremada sin nisina. Resultados similares se obtuvieron con *L. monocytogenes*

Jalisco. El emulsionador no iónico, Tween 80, parcialmente contrarrestó disminuciones de la actividad de la nisina en las leches, mientras que el emulsionante aniónico, lecitina, no tuvo ningún efecto. La adición de Tween 80 aumentó significativamente la actividad de la nisina contra *L. monocytogenes* en leche independientemente de su contenido de grasa. Estudios recientes indican que la membrana citoplasmática es el objetivo principal y se ve interrumpida por la interacción de la nisina con sus componentes fosfolípidos, los experimentos del mismo estudio demostraron que diversos fosfolípidos antagoniza la actividad de la nisina in vitro³⁷.

El aislamiento y la purificación de dos bacteriocinas 3D producidas por *Enterococcus faecium* realizado en el 2009 por Bayoub et al. se encontró que la cepa 3D, aislado de producto lácteo fermentado tradicional marroquí, e identificado como *Enterococcus faecium*, se estudió por su capacidad para producir dos bacteriocinas que actúan contra *Listeria monocytogenes*. Análisis de espectrometría de masas mostró que *E. faecium* 3D produjo dos bacteriocinas: Enterocina 3Da (3893.080 Da) y Enterocina 3Db (4203.350 Da). Esta cepa es de grado calidad alimentaria y sus bacteriocinas fueron péptidos estables al calor en pH básico, neutro, y ácido: tales bacteriocinas pueden ser de interés como conservantes de alimentos²³.

La nanotecnología es reconocida como una fuente potencial de nuevos productos y procesos para la industria alimenticia. Sin embargo, sólo investigación limitada se ha realizado de nanotecnología en los alimentos y productos relacionados con la alimentación y el desarrollo global de nano-alimentos parece estar en su etapa inicial. Por lo tanto, la tecnología de la encapsulación es explorada como una alternativa para proteger a los antimicrobianos, potencialmente mejorar su eficacia y estabilidad en los alimentos. La encapsulación en liposomas, compuesta por una o más bicapas de fosfolípidos que encapsulan un volumen de medio acuoso, aparece como alternativa prometedora²⁸.

Patricia da Silva et al. Tuvieron como objetivo de investigación la evaluación de la eficacia de la nisina libre (sin encapsular) y nisina encapsulada en una nanovesícula para controlar *L. monocytogenes* en superficies de quesos frescos Minas Frescal a 6-8 ° C. La nisina comercial fue encapsulada en liposomas de lecitina de soja parcialmente purificados. La nisina libre (0,1 mg / ml y 0,25 mg / ml) y encapsulada en la nanovesícula (0,25 mg / ml) se aplicó sobre la superficie de muestras de queso, y *L. monocytogenes* fue inoculada antes de la incubación a 6-8 ° C durante 28 días. Un efecto bactericida se observó con 0,25 mg / ml de la nisina libre; un efecto bacteriostático se observó para la nisina encapsulada en liposomas y nisina libre de 0,1 mg / ml. La nisina libre era más eficiente que los liposomas nisina-cargado en el control de *L. monocytogenes*. Debido a la escasa información disponible sobre este tema, esta investigación contribuye a evaluación de la viabilidad y conveniencia de aplicar nanovesículas nisina-cargada en matrices de alimentos semisólidos, como los quesos. Sin embargo la nisina actuó como una barrera adecuada dentro de la tecnología de obstáculos, potencialmente se amplificando la vida útil y la seguridad de los quesos frescos²⁸.

4.2.1 Parte 2: Optimización y validación de métodos analíticos cualitativos

En matemáticas la optimización es la selección del mejor elemento con respecto a algún criterio, en este caso el crecimiento de *L. monocytogenes*, de un conjunto de variables disponibles. La idea de realizar la optimización del método de detección de dicho microorganismo es la elaboración del método alternativo, el cual según el Sistema Nórdico para la Validación de Métodos Microbiológicos, NordVal es el procedimiento para demostrar si los resultados obtenidos por dicho método son comparables con aquellos obtenidos utilizando los métodos de referencia⁷³. Los resultados de dicha optimización, es decir el método alternativo, serán utilizados para llevarse a cabo un proceso de validación cualitativa.

4.2.2 Validación de métodos cualitativos

Según la Organización Internacional para la Estandarización ISO 9000:2005, la validación no es más que la confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de datos que respaldan la existencia o veracidad de algo, estos pueden obtenerse por medio de la observación, medición, ensayo/prueba u otros medios que han cumplido los requisitos para una utilización o aplicación específica prevista⁷⁴. En la mayoría de los métodos analíticos cualitativos se identifica la presencia o ausencia del analito en una muestra por encima de un determinado nivel^{75,76}.

Los principales órganos reguladores a escala mundial, dedicados a estos temas, son: International Organization for Standardization (ISO), Association of Official Analytical Chemists (AOAC), Association Française de Normalisation (AFNOR), European Standardization Committee (CEN) y Nordic System for Validation of Alternative Microbiological Methods (NordVal), quienes proponen esquemas para la validación de estos métodos alternativos, donde recomiendan diferentes parámetros a determinar, coincidiendo entre sí en muchos de estos, pero con algunas diferencias.

La validación cualitativa de los métodos alternativos comprende una parte de análisis, verificación y documentación que son parte valiosa, ya que implican como paso previo la definición de los requisitos analíticos o parámetros de calidad, que se precisan y una vez definidos, el siguiente paso consiste en determinarlos⁷⁵. Se debe tener en cuenta la fase, si es intra o inter-laboratorial.

Los procedimientos descritos en ISO 16140:2003⁷⁷, AFNOR y NordVal, requieren que el laboratorio experto esté acreditado para realizar estudios en el campo de la aplicación para la cual se hace el estudio, sin embargo, esto no constituye una exigencia para AOAC^{78,79}.

4.2.3 Fases de la validación

La validación se divide en dos fases:

Según ISO⁷⁷ y NordVal, la primera fase es un estudio de comparación de método alternativo contra el método de referencia, y es desarrollado por el laboratorio organizador. La Asociación de Químicos Analíticos Oficiales AOAC la nombra como estudio precolaborativo, y otras normas como ISO 13843:2000, definen la primera fase de validación como primaria.

Todas coinciden en el criterio de que esta primera fase de la validación tiene como objetivo principal proporcionar toda la información posible respecto al nuevo método, objeto de estudio, el recobrado y/o enumeración del microorganismo diana, rangos óptimos de concentraciones del

microorganismo en la muestra donde se obtengan los resultados más satisfactorios, la selectividad y especificidad (falsos positivos y negativos), incertezas de recuento (analista y metodológica), y un estimado general de precisión. Además, se pueden analizar los requerimientos del método como tiempo y temperatura de incubación, preparación del medio y condiciones de almacenamiento y pre-tratamiento de la muestra⁷³.

La segunda fase de la validación, según NordVal, consiste en un estudio colaborativo, considerado de igual manera por AOAC Internacional, aunque este último además lo define como estudio colaborativo inter-laboratorio. ISO refiere esta fase como estudio inter-laboratorio, y la norma ISO 13843, validación secundaria. NordVal e ISO definen el objetivo de esta fase como: determinar la variabilidad de los resultados obtenidos en diferentes laboratorios utilizando muestras idénticas, añadiendo la norma ISO que estos resultados, además, serán comparados con aquellos obtenidos en el estudio de comparación de métodos⁷⁷.

Para la AOAC Internacional, el propósito es proveer un estimado real de los atributos del método, particularmente en las desviaciones sistemáticas y aleatorias, esperadas cuando el método sea utilizado en la práctica diaria.

Esta fase de la validación es organizada y controlada por el laboratorio experto, pero desarrollada en otros laboratorios colaboradores y tiene como objetivo principal observar el comportamiento del método utilizando muestras comunes, así como situaciones que pudieran ocurrir cuando el uso del método sea extendido a la práctica. Ambas fases de validación son aplicadas a métodos analíticos cualitativos cuya respuesta es la presencia o ausencia del analito, detectado directa o indirectamente en una cantidad determinada de muestra⁷³.

En el caso del presente estudio, se enfocan los esfuerzos hacia la realización de la primera fase de una validación cualitativa, para el método alterno producto de la optimización, de acuerdo a la ISO 16140:2003 y a la NTC 5014:2001 donde para los métodos cualitativos se evalúa únicamente la exactitud relativa (AC), la desviación positiva (PD), la desviación negativa (ND), la sensibilidad relativa (SE), y la especificidad relativa (SP). Es de gran importancia tener muestras de alimentos naturalmente contaminados con el analito a ser detectado en la validación; según la norma, se debe recolectar un total de 30 muestras y en lo posible deben ser obtenidas de la más extensa variedad de fuentes para así ampliar el rango de validación.

De esas 30 muestras, debe haber aproximadamente 50% de resultados positivos y 50% de resultados negativos, de tal manera que si en las muestras recolectadas no hay un número considerable de muestras positivas, deberá contaminarse el resto de manera artificial, para lograr así una aproximada equivalencia y obtener resultados confiables en la validación¹³.

- **Exactitud:** se define como el grado de concordancia entre la respuesta obtenida por el método de referencia y la respuesta obtenida por el método alterno con muestras idénticas. La exactitud depende de los errores sistemáticos que intervienen en la medición, denotando la proximidad de una medida al verdadero valor y, en consecuencia, la validez de la medida. la exactitud está relacionada con el sesgo de una estimación. Cuanto menor es el sesgo más exacta es una estimación. Cuando se expresa la exactitud de un resultado, se

expresa mediante el error absoluto que es la diferencia entre el valor experimental y el valor verdadero.

- **Desviación positiva:** el método alterno se convierte en un falso positivo cuando presenta una desviación positiva, si suministra un resultado positivo cuando el método de referencia da un resultado negativo.
- **Desviación negativa:** el método alterno presenta una desviación negativo si suministra un resultado negativo cuando el método de referencia da un resultado positivo.
- **Especificidad:** es la habilidad del método de medir exactamente un analito determinado o su cantidad, dentro de la muestra y sin interferencia de componentes no diana como el efecto de la matriz o el ruido de fondo^{73,80}.

La especificidad se define como:

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

Donde VN, son los verdaderos negativos; y FP, los falsos positivos.

- **Sensibilidad:** es la habilidad del método alternativo cualitativo para detectar el analito cuando es detectado por el método de referencia¹³.

La sensibilidad se define como:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

Donde VP es verdaderos positivos y FN falsos negativos.

Varianza y desviación estándar

Varianza es la medida de dispersión absoluta que se define como la media de la suma de cuadrados de las diferencias entre cada dato y la media aritmética de la muestra. Cuando se calcula en una muestra de n elementos, se simboliza por S^2 y está dada por la fórmula⁸¹:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

Donde en el numerador se encuentra la suma de cuadrados y el denominador indica el número de grados de libertad.

El número de grados de libertad de una variable aleatoria se define como el número de observaciones de las que se puede disponer libremente o también como la diferencia entre el tamaño de la muestra (n) y el número (a) de parámetros estimados a partir de la muestra⁸¹.

$$gl = v = n-a$$

La varianza de la población se simboliza como σ^2 .

La varianza tiene como unidad el cuadrado de la medida de la variable que describe. Esta unidad, en algunos casos, es difícil de interpretar; por este motivo se utiliza la desviación estándar que es la raíz cuadrada de la varianza y que, en consecuencia, tiene las mismas unidades que la variable que describe⁸¹.

$$s = \sqrt{s^2}$$

5. METODOLOGÍA

5.1 Búsqueda bibliográfica en bases de datos

La realización de la revisión bibliográfica contó con una búsqueda en las bases de datos que están disponibles on line en la Universidad Libre, y bases de datos de libre acceso. Se usaron los operadores booleanos “AND”, “OR” y “NOT” para una búsqueda más específica.

Las bases de datos consultadas de la Universidad Libre fueron: ProQuest (<http://search.proquest.com/advanced?accountid=46889>), Science Direct (base de datos local) (<http://www.sciencedirect.com/>), ICONTEC (http://e-normas.icontec.org/icontec_enormas_mobile/Logon.aspx?us_GUID=70056afa-df59-4d72-b6a2-287d8e0ffd37) y EBSCO (<http://web.a.ebscohost.com/ehost/search/basic?sid=a2c116c9-9ec1-405f-ae94-5ebdcefd5c57%40sessionmgr4005&vid=0&hid=4101>) (Fig.2). Otras bases de datos a las que se tuvo acceso fueron: Nature (<http://www.nature.com.ezproxy.unal.edu.co/index.html>), Google Académico (<https://scholar.google.es/>) y PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) (Fig.3).

La interfaz de algunas páginas permitió tarar la información sin necesidad de escribir los operadores lógicos, ya que las mismas los incluían, como es el caso de Science Direct y ProQuest.

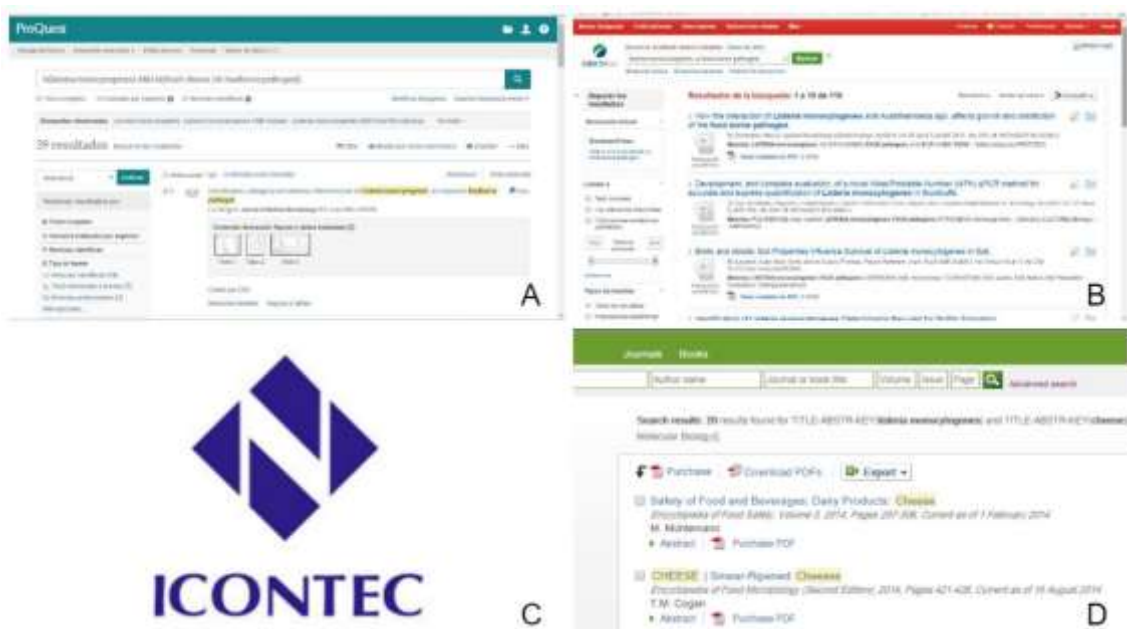


Figura 2. Resultados de búsqueda en las diferentes páginas web con las que cuenta la biblioteca virtual de la Universidad Libre. A: búsqueda en la base de datos ProQuest con el operador booleano AND y las palabras de interés: *Listeria monocytogenes* AND cheese. B: resultados de la búsqueda en EBSCO con las palabras:

Listeria monocytogenes a foodborne pathogen. C: búsqueda de las Normas Técnicas Colombianas referenciadas en el documento. D: resultados de la búsqueda en Science Direct en artículos que contuvieran las palabras *Listeria monocytogenes* y cheese en el título y palabras clave.

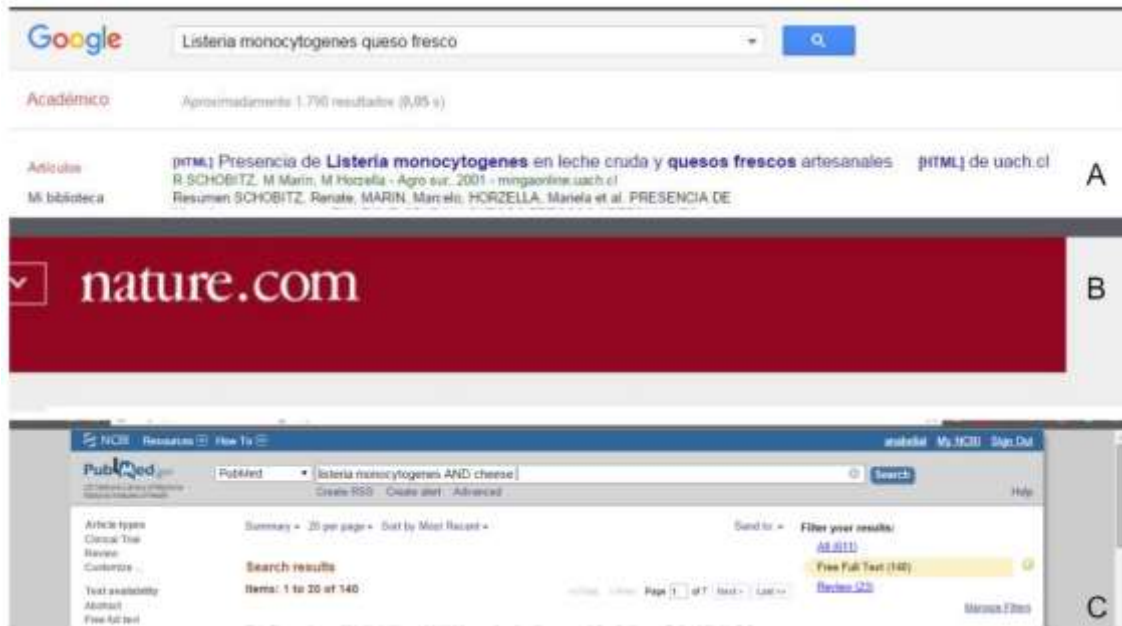


Figura 3. Busca bibliográfica en bases de datos especializadas y libres. A: búsqueda en Google Académico de artículos referentes a *Listeria monocytogenes* en queso fresco. B: búsqueda en Nature de *Listeria monocytogenes* AND cheese. C: resultados de la búsqueda de *Listeria monocytogenes* AND cheese en textos completos gratis dentro de la base de datos de divulgación científica PubMed.

5.2 Tipo de estudio

Se realizará un estudio descriptivo analítico ya que pretende establecer una optimización para la validación del método horizontal en la determinación de presencia o ausencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco, analizando las variables establecidas por la NTC 5014:2001, que son exactitud, desviación positiva, desviación negativa, especificidad, sensibilidad, varianza y desviación estándar.

Los análisis se realizarán en las instalaciones del laboratorio de investigación de la Universidad Libre sede Belmonte Seccional Pereira, Risaralda.

5.3 Población

Se recolectarán 30 muestras de queso fresco en los municipios del departamento de Risaralda, las muestras serán tomadas por los técnicos de saneamiento de la Secretaría de Salud y Seguridad Social de Pereira de manera aleatoria simple en cada uno de los municipios.

Las muestras se recolectarán según el protocolo establecido y se transportarán en neveras de icopor con pila refrigerante.

5.4 Procedimiento toma de muestras

La toma de muestras de queso fresco se basará en el procedimiento descrito en la NTC 666:1996⁸² leche y productos lácteos, guía para muestreo.

Como primera instancia las neveras de icopor destinadas a depositar las muestras se limpiarán y desinfectarán con etanol al 70% (v/v) y se secarán al aire para eliminar olores extraños.

Las bolsas de polipropileno estériles utilizadas para introducir las muestras se rotularán con la siguiente información: nombre o firma y número de identificación de la persona responsable de la toma de la muestra, lugar, fecha, hora, y nombre de la muestra; como siguiente paso, el responsable de la toma de muestra con los implementos de bioseguridad debidamente portados, tomará las muestras de queso (mínimo 100gr) sin remover su empaque original. Posteriormente, las bolsas de polipropileno con la muestra contenida, se depositarán en las neveras en condiciones de refrigeración entre 0 y 4°C para mantener la cadena de frío y evitar la alteración de las muestras. Por último las condiciones de transporte se mantendrán controladas, evitando la exposición de las neveras a olores rancios, luz directa y demás condiciones adversas. Una vez llegadas al laboratorio las muestras se analizarán en el transcurso de las primeras 24 horas manteniendo las condiciones de almacenamiento (cadena de frío)⁸²

5.5 Método de detección horizontal de *Listeria monocytogenes*

Según la Norma Técnica Colombiana 4666:1999 la detección horizontal de *L. monocytogenes* se realiza cumpliendo los pre-enriquecimientos, enriquecimientos, identificación y confirmación por diferentes pruebas bioquímicas enunciadas en la **Figura 1** plasmada anteriormente en el marco teórico.

5.5.1 Preparación muestra:

Se añade una porción de 25 gr de la muestra en 225 ml del medio de enriquecimiento selectivo primario y se homogeniza la muestra.

5.5.2 Enriquecimiento selectivo primario:

En este caso se puede utilizar tres caldos diferentes para pre-enriquecer el microorganismo objeto: Caldo Fraser, Caldo Leb-1 y Caldo Palcam.

El Caldo Fraser está compuesto por una base de peptona de carne (5 g), triptona digerido (5 g), extracto de carne (5 g), extracto de levadura (5 g), cloruro sódico (20 g), fosfato monoácido de sodio dihidrato (12 g), fosfato diácido de potasio (1,35 g), esculina (1 g) en 1000 ml de agua, se esteriliza en el autoclave por 15 minutos a 121°C; si se cuenta con el medio base completo ya deshidratado se calienta y luego se esteriliza con los mismos requerimientos. La base del medio se complementa con una solución de cloruro de litio (3 g en 10 ml de agua), sal sódica de ácido nalidíxico (0,1 g en 10 ml de agua), clorhidrato de acriflavina (0,25 g en 100 ml de agua) y citrato amónico de hierro III (5 g en 100 ml), estos complementos se esterilizan por filtración y son añadidos al momento de utilizar el medio en las siguientes proporciones: base (100 ml), solución de

cloruro de litio (1 ml), sal sódica del ácido nalidíxico (0,1 ml), clorhidrato de acriflavina (0,5 ml) y citrato amónico de hierro III (1 ml).

El Caldo Leb-1 cuenta con una composición de proteasa peptona (5 g), triptona (5 g), extracto de carne purificada (5 g), extracto de levadura (5 g), cloruro de sodio (20 g), fosfato de potasio (1,3 g), fosfato disódico (12 g), ácido nalidíxico al 2% en NaOH 0,1 N (1,0 ml) en 1000 ml de agua; todos los componentes se disuelven en 1000 ml de agua y se lleva a esterilizar en el autoclave por 15 minutos a 121°C y en el momento de utilizar se adiciona 0,225 ml de solución acuosa al 1% de acriflavina.

El Caldo Palcam tiene una composición base de peptona (23 g), extracto de levadura (5 g), cloruro de litio (10 g), esculina (0,8 g), citrato de amonio y hierro III (0,5 g), D (-) manitol (5 g), rojo de fenol (0,08 g), lecitina de soja (2 g), tween 80 disuelto en 1000 ml de agua, se esteriliza en el autoclave por 15 minutos a 121°C; si se cuenta con el medio base completo ya deshidratado se calienta y luego se esteriliza con los mismos requerimientos. 500 ml de la base del medio se complementa con sulfato de polimixina (5 mg), ceftacidina (10 mg) y acriflavina (2,5 mg).

La muestra para el ensayo se homogenizan en los medios y se incuba a 30 °C durante 24 horas.

5.5.3 Enriquecimiento selectivo secundario:

El enriquecimiento secundario se puede realizar mediante dos medios de cultivo líquidos: Caldo Fraser o Caldo Leb-2, donde ambos medios cumplen con las mismas características descritas en el enriquecimiento selectivo primario respectivamente, las muestras se incuban a 30°C por 24 a 48 horas.

5.5.4 Aislamiento e identificación:

Partiendo del cultivo de enriquecimiento primario y secundario, se toma por medio de un asa una porción del cultivo y se siembra por agotamiento en los medios de siembra selectivos: agar Oxford o agar Palcam.

La base del agar Oxford está compuesta por agar columbia (39 g), esculina (1 g), citrato amónico de hierro III (0,5 g), cloruro de litio (15 g) para 1000 ml de agua, se disuelven todos los componentes en el agua por ebullición y se esteriliza durante 15 minutos en el autoclave a 121°C. El suplemento del medio cumple con la siguiente composición: cicloheximida (400 mg), sulfato de colistina (20 mg), clorhidrato de aciflavina (5 mg), cefoletan (2 mg), fosfomicina (10 mg), etanol (5 ml) y agua (5 ml), todo se esteriliza por filtración y se añade al medio para luego dispensarse en las cajas de Petri completamente estériles, se deja solidificar y se almacenan protegiéndolos de la luz.

El agar Palcam cuenta con una base compuesta por peptona (23 g), almidón (1 g), cloruro de sodio (5 g), extracto de levadura (3 g), agar (9 a 18 g), D-glucosa (0,5 g), D-manitol (10 g), esculina (0,8 g), citrato amónico de hierro III (0,5 g), rojo de fenol (0,08 g), cloruro de litio (15 g), todos los componentes se disuelven en 960 ml de agua por ebullición y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. La base del medio se complementa con una solución de sulfato de polimixina B (0,1 g en 100 ml de agua), solución de clorhidrato de acriflavina (0,05 g en 100 ml de agua), solución de ceftazidima sódica pentahidrato (0,116 g en 100 ml de agua), estos complementos se esterilizan por filtración y son añadidos al momento de utilizar el medio en las siguientes proporciones: base (960 ml), solución de sulfato de poliximina (10 ml), solución de clorhidrato de acriflavina (10 ml) y

solución de ceftazidima sódica pentahidrato (20 ml), se añade agitando suavemente entre cada adición, se sirven en las cajas de Petri y se almacena en un lugar protegido de la luz.

Después de inocular las colonias se incuban a 35°C y se examina después de 24 horas y si es necesario después de 48 h, para comprobar la presencia de colonias características, presumiblemente de *Listeria* spp.

5.6 Confirmación de *Listeria* spp.

5.6.1 Selección de colonias para su confirmación:

Para la confirmación se toman de cada caja de cada medio selectivo Oxford o Palcam, cinco colonias sospechosas de ser *Listeria* spp. Se extienden las colonias seleccionadas en la superficie de las cajas secadas previamente, de agar triptona soja extracto de levadura (TSYEA) permitiendo que las colonias se desarrollen bien separadas.

El agar triptona soja extracto de levadura se compone de 30 g de caldo triptona soja (preparado con triptona (17 g), peptona de soja (3 g), cloruro sódico (5 g), fosfato de hidrogeno dipotásico (2,5 g) y 2,5 g de glucosa), extracto de levadura (6 g), agar (9-18 g), todos los componentes disueltos en 1000 ml de agua por ebullición, se esteriliza durante 15 minutos en el autoclave a 121°C, se dispensa el medio en cajas Petri estériles, en cantidades adecuadas para el análisis. Se espera a su solidificación.

Las cajas inoculadas con las colonias se incuban a 35°C durante 18 o 24 h o hasta que el crecimiento sea satisfactorio.

Las colonias sospechosas tienen de 1 mm a 2 mm de diámetro, son convexas, incoloras y opacas, con borde definido. Si las colonias no están bien aisladas, se replica una colonia típica de *Listeria* spp en otra caja de TSYEA. Las siguientes pruebas deben efectuarse a partir de cultivos puros en TSYEA.

5.6.2 Reacción de la catalasa:

Se toma una colonia separada con un asa y se suspende en una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3% (m/m) en una lámina. La formación inmediata de burbujas de gas indica una reacción positiva.

5.6.3 Tinción de Gram:

Se efectúa la tinción a partir de una colonia aislada. *Listeria* spp se observa como bacilos cortos y estrechos Gram positivos.

5.6.4 Prueba de motilidad:

Se inocula con asa recta por punción central en tubos con agar motilidad y se incuban a 25°C de dos a cinco días.

El agar motilidad tiene entre sus componentes la peptona de caseína (20 g), peptona de carne (6,1 g) y agar (3,5 g) disueltos por ebullición en 1000 ml de agua, se dispensa 5 ml del medio en tubos y se esteriliza en el autoclave a 121°C durante 15 minutos.

5.7 Confirmación de *L. monocytogenes*

5.7.1 Ensayo de hemólisis:

Si las características morfológicas y la reacción de la catalasa son sospechosas de *Listeria* spp., se realiza la prueba de hemólisis.

Se deja secar convenientemente la superficie del agar base con sangre de cordero antes de su uso. Se toma una colonia aislada, se siembra para cada cultivo utilizando un asa. Simultáneamente, se siembran controles positivos (*L. monocytogenes*) y negativos (*L. innocua*).

El agar base con sangre de cordero cuenta con una base que se compone de peptona de carne (15 g), digestato enzimático de hígado (2,5 g), extracto de levadura (5 g), cloruro sódico (5 g) y agar (9-18 g) disueltos en 1000 ml de agua por ebullición, se esterilizan en el autoclave a 121°C durante 15 minutos. Para la base completa se utilizan 100 ml de la base anteriormente descrita y de 5 a 7 ml de sangre de cordero desfibrinada enfriada a 47°C, se dispensa el medio en cajas Petri estériles, en cantidades adecuadas para el análisis, se deja solidificar.

Después de incubar a 35°C durante 24 horas, se examinan las cepas control y las muestras. *L. monocytogenes* presenta zonas aclaradas y estrechas (β -hemólisis) *L. innocua* no muestra zonas claras alrededor de la siembra. *L. seeligeri* muestra zonas de hemólisis débiles. *L. ivanovii* habitualmente muestra zonas anchas claramente delineadas de β -hemólisis. Se examinan las cajas bajo una luz brillante para comparar los cultivos bajo ensayo con los controles.

5.7.2 Utilización de carbohidratos:

Se inocula cada uno de los caldos de carbohidratos (ramnosa, xilosa y manitol) con un cultivo en TSYEB utilizando un asa. Se incuba a 35°C hasta 5 días.

El caldo base de carbohidratos se compone de una base que cuenta con proteasa peptona (10 g), extracto de carne (1 g), cloruro sódico (5 g) y púrpura de bromocresol disueltos en 1000 ml de agua, se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Para el medio completo se utilizan los tres carbohidratos: L-ramnosa, D-xilosa y manitol, 5 g en 100 ml de agua por separado y se esterilizan por filtración. A 9 ml del medio base se le añaden 1 ml de cada carbohidrato.

Una coloración amarilla indica una reacción positiva (formación de ácido) y tiene lugar generalmente entre 24 y 48 horas.

Listeria monocytogenes se distingue de otras especies por las características que aparecen en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Reacciones para la identificación de *Listeria* spp

Especies	Hemólisis	Producción de ácido			Prueba de CAMP	
		Rhamnosa	Xilosa	Manitol	S.aureus	R.equi
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	-	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	+	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	V	-	+	-	-

V = Reacción variable

(+) = Reacción débil

+ = >90% reacción positiva

- = sin reacción

5.8 Matriz de control de calidad para análisis en el laboratorio

Es de gran importancia registrar las condiciones en las que se encuentra el laboratorio de investigación de la universidad destinado para el desarrollo de los análisis en las muestras. La **Tabla 3** muestra los procedimientos de control, limpieza y desinfección tanto de los materiales, analista, ambiente y superficie, como los equipos y medios de cultivo, así mismo, los procesos preventivos y los casos de Peligros y Puntos Críticos de Control (PCC). Esto con el fin de reducir y controlar la posibilidad de contaminación cruzada de la muestra y establecer una iniciativa de Buenas Prácticas de Laboratorio. En los anexos se encuentran los Procedimientos Operativos Estandarizados de Saneamiento (POES) para la limpieza y desinfección específica para cada uno de los parámetros de la matriz de control de calidad.

5.9 Optimización del método

Este proceso se realizará modificando las variables tiempo y temperatura de cada uno de los medios de cultivo sugeridos por la NTC 4666:1999, para obtener los resultados que presenten el mejor rendimiento para el crecimiento de *L. monocytogenes*. De acuerdo al rendimiento más óptimo, se desarrollará el método alterno que será utilizado para la validación cualitativa.

En la **Tabla 2** se observan los ajustes propuestos al método teniendo en cuenta las características de crecimiento que presenta *L. monocytogenes* además de las condiciones indicadas en la norma para su siembra. Las condiciones tomadas en cuenta representan rangos superiores, estándares e inferiores predichos en la norma. Cabe destacar que cada posibilidad de condiciones se realizará por triplicado.

5.10 Análisis de datos

Los resultados de la optimización serán analizados por ANOVA a través del paquete estadístico STATGRAPHICS Centurion, el cual es una potente herramienta de análisis de datos que combina una amplia gama de procedimientos analíticos con gráficos interactivos que proporcionan un entorno integrado de análisis que puede ser aplicado a cada una de las fases del proyecto.

Con los datos obtenidos de la optimización del método, se procederá a la validación cualitativa del crecimiento de *L. monocytogenes* en los triplicados de muestras de queso fresco producido en los departamentos de Risaralda. Se tomarán cada uno de los ajustes realizados y se verificará cual fue el medio de cultivo, el tiempo y la temperatura de incubación óptimas para este microorganismo. Se evaluarán los parámetros de validación de métodos cualitativos dictados por la NTC 5014:2001: exactitud, desviación positiva, desviación negativa, especificidad, sensibilidad, varianza y desviación estándar.

Tabla 2. Ajustes realizados al método de detección de *Listeria monocytogenes* descrito en la NTC 4666:1999. Parámetros que se evaluarán para la validación del método cualitativo alternativo.

ETAPA	MEDIO DE CULTIVO	TEMPERATURA	TIEMPO DE INCUBACIÓN
ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO PRIMARIO	Caldo Fraser	25 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		30 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		35 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
	Caldo Leb-1	25 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		30 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		35 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
Caldo Palmac	25 °C	24 horas	
		36 horas	
		48 horas	
	30 °C	24 horas	
		36 horas	
		48 horas	

			48 horas
			24 horas
		35 °C	36 horas
			48 horas
ENRIQUECIMIENTO SELECTIVO SECUNDARIO	Caldo Leb-2	25 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		30 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
	Caldo Fraser	35 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		25 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN	Agar Oxford	30 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		35 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
	Agar Palcam	40 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		30 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
CONFIRMACIÓN – SELECCIÓN COLONIAS	Agar Tripton de Soja Extracto de Levadura	35 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		30 °C	18 horas
			24 horas
			36 horas
		35 °C	18 horas
			24 horas

			36 horas
			18 horas
		40 °C	24 horas
			36 horas
PRUEBA MOTILIDAD	Agar Motilidad	25 °C	2 días
			5 días
			8 días
		30 °C	2 días
			5 días
			8 días
	SIM	35 °C	2 días
			5 días
			8 días
		30 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
CONFIRMACIÓN <i>L. monocytogenes</i>	Agar Sangre de Cordero	35 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
		40 °C	24 horas
			36 horas
			48 horas
ENSAYO HEMÓLISIS	Caldo Triptona Extracto de Soya	30 °C	2 días
			5 días
			8 días
		35 °C	2 días
			5 días
			8 días
UTILIZACIÓN DE CARBOHIDRATO	Caldo Triptona Extracto de Soya	40 °C	2 días
			5 días
			8 días
		30 °C	2 días
			5 días
			8 días

Tabla 3. Matriz de registro de control de calidad estándar para el análisis en el laboratorio.



MATRIZ DE REGISTRO DE CONTROL DE CALIDAD ESTÁNDAR PARA ANÁLISIS EN EL LABORATORIO

CÓDIGO
FECHA

OBJETIVO Reducir y controlar la posibilidad de contaminación de todos los factores que intervienen al momento de realizar el análisis y que, de algún modo pueda afectar los resultados. Además brindar confiabilidad en los datos obtenidos.

ETAPAS	PIEZA Y DESINFECCIÓN	FRECUENCIA	DESCRIPCIÓN PELIGRO	PCC	ACCIÓN PREVENTIVA	CONTROLES DE CALIDAD DE LABORATORIO		FORMATO, USO Y REGISTROS	
MATERIAL DE VIDRIO	Lavado con detergente neutro o desinfectante industrial antes y después de su uso	Cada práctica	Presencia de residuos biológicos o de detergente que puedan contaminar la muestra y afectar el resultado final	Si	Lavado con abundante agua para remover residuos de detergente, empaçado individual en papel craft y esterilización en autoclave	Prueba de residuos de detergente con azul de bromotimol al 1%, Secado en horno y Uso de cinta testigo		POES 01 (Anexo 1)	
ANALISTA	Lavar las manos antes, durante y después con jabón líquido industrial	Cada práctica	Contaminación por microbiota natural humana	Si	Uso de implementos de bioseguridad (bata larga, guantes estériles, cofia, tapabocas)	Prueba de KOH para análisis de hongo en uñas, pulpejos, cropológico y capacitaciones (cada mes)		POES 02 (Anexo 2)	
AMBIENTE	Aspersión con desinfectante antes y después	Cada práctica	Exposición de la muestra, cultivos y medios de cultivo a partículas de polvo, microorganismos polulantes en el ambiente que pueden contaminar y generar un resultado erróneo	Si	Aspersión con hipoclorito de sodio diluido antes y después, libre de suciedad e impurezas	Siembra microbiológica del ambiente	M E N S U A L	POES 03 (Anexo 3)	
SUPERFICIES			Presencia de residuos biológicos, químicos y físicos que contaminen la muestra	Si	Limpieza de superficies con hipoclorito de sodio diluido antes y después	Siembra con técnica de hisopado en agar nutritivo antes y después de la limpieza		POES 04 (Anexo 4)	
E Q U I P O S	AUTOCLAVE	Limpiar con un paño impregnado de alcohol antes y después	Derrames de material de descarte que deterioren el equipo	No	Encendido y sin inconvenientes, presión y temperatura adecuadas. Utilización de aluminio en las bandejas para evitar derrames	Llenar formatos de uso e indicar observaciones		Formato de Uso 01 (Anexo 5) POES 05 (Anexo 6)	
	INCUBADORA			Si	Conexión a luz	Verificar esterilidad incubando medio de cultivo sin inóculo	Formato de Uso 02 (Anexo 7) POES 06 (Anexo 8)		
	CABINA	Limpiar con un paño impregnado de alcohol la zona de las paredes y utilizar un ciclo de luz UV de 20 minutos a 2 horas antes y después	Contaminación cruzada	Si	Verificar encendido, utilización de papel craft retener derrames, máximo dos manipuladores presentes y ambiente controlado	Prueba de ambiente de la cabina		Formato de Uso 03 (Anexo 9) POES 07 (Anexo 10)	
	NEVERA	Limpeza con detergente neutro y aspersión con alcohol	Mensual	Contaminación cruzada	No	Conexión a luz, almacenar solo material limpio	Prueba de ambiente de la nevera		POES 08 (Anexo 11)
	BALANZA ANALÍTICA	NA	NA	Descalibración	No	Hacer uso del papel aluminio para evitar derrames y descalibración, tarar	Calibración cada seis meses		Formato de Uso 04 (Anexo 12)
AGUA DESTILADA	Lavar con detergente neutro los frascos plásticos que contienen el agua destilada	Semanal	Contaminación del agua por medio de los frascos y su constante manipulación	Si	No regresar excedente de agua al frasco y utilizarla en el menor tiempo posible	Realizar prueba microbiológica al agua		POES 09 (Anexo 13)	
MEDIOS DE CULTIVO	NA	NA	Pérdida de propiedades y nutrientes del medio debido a su fecha de caducidad, retención de humedad y contaminación	Si	No regresar excedente al frasco, utilizar espátulas estériles, guardar los frascos boca abajo una vez abiertos y verificar fecha de vencimiento	Prueba ecométrica y de eficacia		Registro de Inventario 01 (Anexo 14)	

OBSERVACIONES

Encargado: Ingrid Tatiana Londoño González - Ana María Núñez Rincón

Cargo: Auxiliares investigadores

Firma:

6. CONSIDERACIONES FINALES

Esta revisión bibliográfica sirve como apoyo para los avances en los estudios de la presencia de *Listeria monocytogenes* en lácteos y derivados en Colombia, además va encaminado al desarrollo de un método ajustado por medio de una optimización de la detección de *Listeria monocytogenes* basado en la NTC 4666:1999 que serviría como base para un proceso de validación cualitativa.

Esta revisión junto con los parámetros propuestos enfocan las bases para lograr la realización de este método alternativo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Contrato 081. Identificación de riesgos biológicos asociados al consumo de leche cruda bovina en Colombia. Instituto Nacional de Salud. 2010.
2. ICBF. Instituto Colombiano de Bienestar Familiar de Colombia. Encuesta Nacional de la Situación Nutricional en Colombia (ENSIN) 2010.
3. Decreto No. 616. Reglamento técnico sobre los requisitos que debe cumplir la leche para consumo humano que se obtenga, procese, envase, transporte, comercializa, expendi, importe o exporte en el país. Ministerio de la protección social de Colombia. 28 de Febrero de 2007.
4. Decreto No. 1880. Se señalan los requisitos para la comercialización de leche cruda para consumo humano directo en el territorio nacional. Ministerio de la Protección Social/Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia. 27 de mayo de 2011.
5. López M, Álvarez C, Chávez J, Guerrero J. Grupo factores de riesgo ambiental, Instituto Nacional de Salud. Informe de vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos, Semanas epidemiológicas 1 a 53, Colombia. 2009.
6. SIVIGILA. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, Colombia. Inf Quinc Epidemiol Nac (IQUEN). 2009; 14 (20):305-20.
7. Bell C, Kyriakides M. *Listeria*. Una aproximación practica al microorganismo su control en los alimentos, 2000. Editorial Acribia, Primera edición. Pág. 173.
8. Mammina C, Aleo A, Romani C, Pellissier N, Nicoletti P, Pecile P, et al. *Characterization of Listeria monocytogenes* isolates from human listeriosis cases in Italy. J Clin Microbiol. 2009; 47:2925-30.
9. Centers for Disease Control and Prevention; National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases. Listeriosis. Atlanta: CDC. (Your Online Source for credible). Disponible en: <http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/listeriosis/>.
10. SIVIGILA. Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública, Colombia. Enfermedades Transmitidas por Alimentos. Bogotá. 2007 – 2010.
11. Álvarez CJ, Guerrero JA, Muñoz MN, López MP, Borbón ME, Espinosa J. Informe epidemiológico de la vigilancia de eventos grupo factores de riesgo ambiental-Colombia 2010. Bogotá: INS; 2010. p. 25.
12. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes*. Parte 1. ICONTEC, 1999 (NTC 4666).
13. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología de alimentos y alimentos para animales. Protocolo Para Validación de Métodos Alternos. ICONTEC, 2001 (NTC 5014).
14. Espinosa J, López MP, Álvarez C, Chávez J, Guerrero JA. Informe de vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos. Semanas epidemiológicas 1 a 53, Colombia, 2009. Bogotá D.C.: Instituto Nacional de Salud; 2009. p. 10.
15. Menchu, M. La Canasta Básica de Alimentos En Centro América. Publicación INCAP ME/105. Guatemala Julio 2002.

16. Robinson R. Dairy Microbiology. Volume 2. The Microbiology of Milk Products. Editorial Applied Science Publishers Ltd. England. Edición lengua española editorial Acribia S.A. España, 1987.
17. Resolución 2310. Se reglamenta parcialmente el Título V de la Ley 09 de 1979, en lo referente a procesamiento, composición, requisitos, transporte y comercialización de los Derivados Lácteos. Ministerio de Salud de Colombia. 24 de Febrero del 1986.
18. Cabrera L, Ferrer A. Evaluación de Cepas de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Enterobacter* como cultivos iniciadores para la elaboración de queso tipo palmita venezolano con leche pasteurizada. Revista científica. FCV-LUZ. 1994. 4(2): 73-78.
19. Contrato 081. Evaluación de Riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia. Ministerio de Salud y Protección Social. 2010.
20. Noticias el Tiempo. Elaboración de quesos caseros. 1998. (Sitio Web). Colombia (Fecha de consulta: 29 de mayo de 2015). Disponible en: <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/MAM-804061>
21. Espinoza A, De la Torre M, Salinas M. Sánchez V. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del Distrito de Ica, Enero - Marzo 2003. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2004, 21(2).
22. Gallegos J, Arrieta G, Poutou R, Trespalacios A, Carrascal A. Frecuencia de *Listeria* Spp., en quesos colombianos costeños. Revista MVZ Córdoba. 2007, 12(2): 996-1012.
23. Bayoub K, Mardad I, Ammar E, Serrano A, Soukri A. Isolation and purification of two bacteriocins 3d produced by *Enterococcus faecium* with inhibitory activity against *Listeria monocytogenes*. Current Microbiology. 2011, 62: 479-485.
24. Bhowmik T, Marth E. Role of *Micrococcus* and *Pediococcus* Species in cheese ripening: A review. Journal of Dairy Science. 1990, 73: 859-866.
25. Beresford T, Fitzsimons N, Brennan N, Cogan T. Recent advances in cheese microbiology. International Dairy Journal. 2011, 11: 259–274.
26. Beerens H, Luquet F. Guide pratique d'analyse microbiologique des laits et des produits laitiers. Technique et Documentation (Lavoisier) París. Edición Lengua Española Editorial Acribia S.A. 1987. España.
27. Davies E, Bevis H, Delves J. The Use of the bacteriocin, nisin, as a preservative in ricottatype cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology. 1997, 24: 343–346.
28. Malheiros P, Daroit D, Brandelli A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in minas frescal cheese by free and nanovesicle-encapsulated nisin. Brazilian Journal of Microbiology. 2012, 1414-1418.
29. Le Loir Y, Baron F, Gautier M. *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. Genetic and Molecular Research. 2003, 2(1): 63-76.
30. Cody S, Abbott S, Marfin A, Schulz B, Wagner P, Robbins K, Mohle J, Vugia D. Two outbreaks of multidrug-resistant *Salmonella* serotype *Typhimurium* DT104 infections linked to raw-milk cheese in Northern California. Journal of the American Medical Association. 1999, 281(19): 1805-1810.


31. FAO. El Marco de Gestión de Crisis para la Cadena Alimentaria (FCC). (Sitio Web). Colombia, (fecha de consulta: 29 de Mayo de 2015). Disponible en: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/agns/pdf/Preventing_Ecoli_es.pdf
32. Hunt D, Bañez M, Neises D, Hansen G. *Campylobacter jejuni* infection associated with unpasteurized milk and cheese. Kansas, 2007. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR). 2009.
33. Schiemann D. Association of *Yersinia enterocolitica* with the manufacture of cheese and occurrence in pasteurized milk. Applied And Environmental Microbiology. 1978, 36(2): 274-277.
34. Morgan S, Galvin M, Ross R, Hill C. Evaluation of a spray-dried lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. Letters in Applied Microbiology. 2001, 33: 387-391.
35. Villanueva M, Martínez D, Peniche A, López A, Rosas T, Morales A, Parissi A, Morales J, Flores R. Presencia de *Brucella* ssp. en quesos frescos elaborados con leche sin pasteurizar en Veracruz, Méx. Asociación Mexicana de Epidemiología Veterinaria AC. VII Congreso Internacional De Epidemiología. San Andrés Cholula, Puebla.
36. Harris N, Payeur J, Bravo D, Osorio R, Stuber T, Farrell D, Paulson D, Treviso S, Mikolon A, Rodriguez A, Cernek S, Rast R, Ginsberg M, Kinde H. Recovery of *Mycobacterium bovis* from soft fresh cheese originating in Mexico. Applied and Environmental Microbiology. 2007, 73(3):1025-1028.
37. Jung D, Bodyfelt F, Daeschel M. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. 1992, Journal of Dairy Science 75:387-393.
38. (FAO) Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y (OMS) Organización Mundial de la Salud. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Resumen Interpretativo. 2004.
39. Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, Microorganismo Zoonótico Emergente. Revista MVZ Córdoba. 2005; 10(1):511-543.
40. Schöbitz R, Ciampi L, Nahuelquin Y. *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. Revista Agro Sur. 2009, 37(1):1-8.
41. Muñoz A. Distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos, Colombia, 2000-2009. Revista Biomédica. 2012, 32:408-17.
42. Velge P, Roche S. Variability of *Listeria monocytogenes* virulence: a result of the evolution between saprophytism and virulence? Future Microbiology. 2010, 5(12):1799-1821.
43. Piednoir E, Botteldoorn N, Yde M, Mahillon J, Roosens N. Development and validation of qualitative SYBR®Green Real-Time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. Appl Microbiology Biotechnology. 2013, 97:4021-4037.
44. Farber J, Peterkin P. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiological Reviews. 1991, 55(3):476-511.
45. Muñoz A, Vargas M, Otero L, Díaz G, Guzmán V. Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, Procedentes de Plazas de Mercado

- y delicatessen de Supermercados de Cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. Revista Biomédica. 2011, 31:428-39.
46. Schoder D, Melzner D, Schmalwieser A, Zangana A, Winter P, Wagner M. Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. Journal of Food Protection. 2011, 74(6):919–924.
 47. Baquero D, Bernal A, Campuzano S. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de Cáqueza, Cundinamarca. NOVA - Publicación Científica. 2006, 4(6):1-114.
 48. Barancelli G, Camargo T, Reis C, Porto E, Hofer E, Oliveira C. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. 2011, Journal of Food Protection 74(5):816-819.
 49. Czuprynski C. *Listeria monocytogenes*: silage, sandwiches and science. 2005, Animal Health Research Reviews 6(2):211–217.
 50. Rodríguez E, Arqués J, Gaya P, Núñez M, Medina M. Control of *Listeria monocytogenes* by bacteriocins and monitoring of bacteriocin-producing lactic acid bacteria by colony hybridization in semi-hard raw milk cheese. 2001, Journal of Dairy Research 68:131-137.
 51. Muñoz A, Chaves J, Rodríguez E, Realpe M. *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. Revista Biomédica. 2013, 33:283-91.
 52. Martino T, Castillo V, Pérez A, De los Reyes M, Suárez F, Lara C. Determinación de *Listeria* Spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. 2005, Revista Cubana Salud Pública 31(3):217-22.
 53. Chaves C, Arias M. Caracterización de cepas de *Listeria monocytogenes* realizados a partir de queso fresco proveniente de diferentes zonas productoras costarricenses. 2009, Archivos Latinoamericanos de Nutrición 59(1).
 54. Schvartzman M, Belessi C, Butler F, Skandamis P, Jordan K. Effect of pH and water activity on the growth limits of *Listeria monocytogenes* in a cheese matrix at two contamination levels. 2011, Journal of Food Protection 74(11):1805–1813.
 55. Farber J, Harwig J, Carter A. Prevention of Foodborne Listeriosis. Canadian Journal of Infectious Diseases & Medical Microbiology. 1991, 2(3):116-120.
 56. Vázquez J, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez G, Goebel W, González B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Reviews. 2001, 14(3):584-640.
 57. Rossi M, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. 2008, Revista Chilena de Infectología 25(5):328-335.
 58. Dalton C, Austin C, Sobel J, Hayes P, Bibb W, Graves L, Swaminathan B, Proctor M, Griffin P. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. 1997, The New England Journal of Medicine. 336(2):100-5.
 59. Secretaria de Salud de Pereira. Aparición de la bacteria *Listeria*. 2011. (Sitio Web) Colombia. (Fecha de consulta: 29 de Mayo de 2015). Disponible en: <http://www.dlspereira.gov.co/intranet/cmsnews/webShow/365>


60. Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. 2013, Revista Chilena de Infectología 30(4):407-416.
61. ELIKA (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria). *Listeria monocytogenes* 2006. 1-13.
62. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Microbiología de alimentos y productos para alimentación animal. ICONTEC, 2009 (NTC 4092).
63. Ramírez L, Morón A, Alfieri A, Gamboa O. Detección de *Listeria monocytogenes* en queso blanco criollo, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 2010, 60(3):254-260.
64. Andrews W. Current state of conventional microbiological methodology for the examination of food. In: Microorganisms in Foods: Now What? 2002. American Society for Microbiology 102-115.
65. Torres K, Poutou R, Carrascal A, Sierra S, Mercado M. Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. Revista Científica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2004, 9(2):414-427.
66. Burbano E, Carrascal K, Mercado M, Poutou R. Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en leches. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 2007, 10(10).
67. OIE. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Capítulo 2.10.14. *Listeria monocytogenes*. 2004. 1222-1237.
68. Martínez R, Villalobos L. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en atún fresco expandido en la ciudad de Cumaná, Venezuela. Revista científica de la universidad de los andes Venezuela. 2004, 14(4).
69. Villalobos L, Martínez R, Aislamiento e identificación por métodos convencionales y PCR de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos frescos comercializados en Cumana, Venezuela. Revista científica Maracaibo. 2007, 17(5).
70. Schöbitz R, Marín M, Horzella M, Carrasco E, Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. Revista Agro sur. 2001, 29(2)
71. Marzocca M, Marucci P, Sica M, Alvarez E. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). Revista argentina de microbiología. 2004, 36(4):179-181.
72. Martino T, Leyva V, Pérez A, Reyes M, Suárez F, Lara C. Determinación de *Listeria* spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. Revista cubana salud pública. 2005, 31(3):217-22.
73. Ortega M, Rodríguez C, Zhurbenko R, Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. Métodos cualitativos. Revista cubana de Higiene y Epidemiología. 2010, 48(2):162-176.
74. Lozada Y, Lobo E, Burgher Y, Duque A, Martínez S. Validación del método de cultivo microbiológico para su utilización en el diagnóstico de micoplasmas en sueros, cultivos celulares y productos biofarmacéuticos. Revista Electrónica de Veterinaria. 2012, 13(11):1-15.

75. Sánchez J, Tejada M, Koch W, Mora J, Marroquín R, Hernández V, Islas V, Sánchez E, De León A. Validación de métodos analíticos no cuantitativos. *Revista mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 2010, 41(2):15-24.
76. Ruisánchez I., Trullols E., Rius X. Validación de métodos analíticos cualitativos. 2003, *Técnicas de Laboratorio* 81: 328-335.
77. ISO 16140:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods.
78. Resolución No. 41. Validación de Métodos Analíticos. La Habana, Cuba: CECMED. 2007.
79. European Commission. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on criteria for evaluation of methods of *Salmonella* detection. 2002.
80. Ortega M, Rodríguez C, Raisa C. Validación de métodos alternativos para análisis microbiológico de alimentos y aguas. *Revista cubana de higiene y epidemiología*. 2013, 51(1):111-121.
81. Cortés R., Validación de métodos analíticos, Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. AEAFI 2001.
82. Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. Leche y productos lácteos. Guía para muestreo. ICONTEC 1996 (NTC 666).


Anexo 2.
 POES
 Limpieza y
 desinfección
 analista

	POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DEL ANALISTA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN ULP			CÓDIGO	02
				REVISIÓN	
				FECHA	
Preparado por:		Revisado por:		Aprobado por:	
Firma:		Firma		Firma	
1. Objetivo	Cumplir con las condiciones de bioseguridad y limpieza del analista para la no contaminación de la muestra				
2. Frecuencia	Cada que se cambie de actividad, antes y después de terminar la práctica				
3. Materiales y equipos	* Jabón de manos líquido antibacterial * Agua * Toallas de papel				
4. Zonas de limpieza	Lavado destinado para la limpieza del analista				
5. Procedimiento	Limpieza: 1. Mojar previamente las manos hasta el codo con abundante agua. 2. Verter un poco del jabón en la palma de la mano y masajear por toda la mano, incluyendo pulpejos y uñas, hasta el codo. 3. Enjuagar con abundante agua 4. Secar con toallas de papel desechables. 5. Utilizar los guantes desechables previamente esterilizados. Desinfección: 1. Utilizar gel antibacterial antes de utilizar los guantes (opcional)				
Observaciones					

Anexo 3. POES
Limpieza y
desinfección del
ambiente

	POES DESINFECCIÓN DE AMBIENTE DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN ULP			CÓDIGO	03
				REVISIÓN	
				FECHA	
Preparado por:		Revisado por:		Aprobado por:	
Firma:		Firma		Firma	
1. Objetivo	Rebajar la carga de contaminantes presentes en el ambiente ya sea físicos, químicos o biológicos				
2. Frecuencia	Antes de cada práctica				
3. Materiales y equipos	* Hipoclorito de sodio diluido				
4. Zonas de limpieza	Cada área de trabajo				
5. Procedimiento	Desinfección: 1. verter hipoclorito de sodio en un recipiente con rociador y esparcir el líquido por todas las zonas de trabajo sin excederse, para así reducir la cantidad de contaminantes presentes en el ambiente.				
Observaciones	Para las prácticas de siembra, además de esta actividad se utiliza también un mechero Bunsen o en su defecto, trabajar en la cabina de flujo laminar para asegurar condiciones estériles.				

Anexo 4.
POES
Limpieza y
desinfección de
superficies

	POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE SUPERFICIES LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN ULP			CÓDIGO	04
				REVISIÓN	
				FECHA	
Preparado por:		Revisado por:		Aprobado por:	
Firma:		Firma		Firma	
1. Objetivo	Eliminación de residuos e impurezas presentes en los mesones del laboratorio				
2. Frecuencia	Antes y después de cada la práctica				
3. Materiales y equipos	* Detergente neutro	* Hipoclorito de sodio diluido	* Toallas de papel desechables		
		* Esponja abrasiva			
4. Zonas de limpieza	Mesones del laboratorio				
5. Procedimiento	Limpieza: 1. Liberar de objetos el área a limpiar. 2. Frotar el área con la esponja y el detergente neutro. 3. Enjuagar con abundante agua. Desinfección: 1. Reverter un poco el hipoclorito de sodio rebajado y dejarlo por unos segundos en el mesón. 2. Retirar el excedente con toallas de papel. 3. Dejar secar.				
Observaciones					


Anexo 5.
POES
Limpieza del
autoclave

	POES LIMPIEZA DEL AUTOCLAVE DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN ULP			CÓDIGO	05
				REVISIÓN	
				FECHA	
Preparado por:		Revisado por:		Aprobado por:	
Firma:		Firma		Firma	
1. Objetivo	Eliminación de residuos de derrames e impurezas presentes en el autoclave del laboratorio				
2. Frecuencia	Antes y después de cada la práctica				
3. Materiales y equipos	* Etanol al 70% * Toallas de papel desechables * Papel aluminio				
4. Zonas de limpieza	Zona de esterilización donde está ubicado el equipo				
5. Procedimiento	Limpieza: 1. Liberar de objetos y de bandejas encontradas dentro del equipo. 2. Impregnar una toalla desechable de etanol al 70% y limpiar cuidadosamente las paredes, superficie y parte superior del interior del equipo. 3. Dejar secar. 4. Impregnar otra toalla desechable con más etanol al 70% y limpiar las bandejas para luego cubrirlas de papel aluminio y así evitar hacer contacto con posibles derrames.				
Observaciones					


Anexo 6.

POES

Limpieza de la incubadora

	POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LA INCUBADORA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN ULP			CÓDIGO	06
				REVISIÓN	
				FECHA	
Preparado por:		Revisado por:		Aprobado por:	
Firma:		Firma		Firma	
1. Objetivo	Proveer un ambiente rebajado en carga microbiana para la buena incubación de los medios de cultivo				
2. Frecuencia	Cada que se vaya a incubar algún cultivo y la incubadora esté vacía				
3. Materiales y equipos	* Alcohol * Incubadora * Toallas de papel desechables				
4. Zonas de limpieza	Incubadora				
5. Procedimiento	<p>Limpieza:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Verificar que la incubadora esté vacía. 2. Limpiar con un paño impregnado con alcohol las paredes y bandejas de la incubadora. 3. No desconectar. <p>Desinfección:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Realizar una aspersion con alcohol por todo el ambiente de la incubadora. 2. Dejar evaporar. 3. Mantener cerrada. 				
Observaciones					

Anexo 7.
POES
 Limpieza y
 desinfección de
 la cabina de
 flujo laminar

	POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE LA CABINA DE FLUJO LAMINAR DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN ULP			CÓDIGO	07
				REVISIÓN	
				FECHA	
Preparado por:		Revisado por:		Aprobado por:	
Firma:		Firma		Firma	
1. Objetivo	Mantener en condiciones de limpieza la cabina de flujo laminar para evitar contaminación cruzada				
2. Frecuencia	Antes y después de cada práctica				
3. Materiales y equipos	* Etanol al 70% * Toallas de papel desechables * papel craft				
4. Zonas de limpieza	Lugar donde está ubicada la cabina de flujo laminar				
5. Procedimiento	Limpieza: 1. Impregnar una toalla desechable de etanol al 70% 2. frotar cuidadosamente por las paredes de la cabina y la superficie. 3. Repetir el proceso. 4. Recubrir el espacio de siembra con papel craft para evitar el contacto con el equipo ante posibles derrames. Desinfección: 1. Encender la luz UV durante 20 minutos aproximadamente.				
Observaciones					

Anexo 8.
POES
Limpieza y
desinfección de
la nevera

	POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE NEVERA LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN ULP			CÓDIGO	08
				REVISIÓN	
				FECHA	
Preparado por:		Revisado por:		Aprobado por:	
Firma:		Firma		Firma	
1. Objetivo	Proveer un ambiente rebajado en carga microbiana para la buena refrigeración de los medios de cultivo				
2. Frecuencia	Mensual				
3. Materiales y equipos	* Alcohol * Nevera * Detergente neutro * Esponja abrasiva * Toallas de papel desechables				
4. Zonas de limpieza	Nevera				
5. Procedimiento	Limpieza: 1. Desocupar la nevera y sacar cada una de sus partes removibles. 2. Limpiar con la esponja y el detergente neutro cada una de los cajones de la nevera, enjuagar. 3. Limpiar el interior de la nevera con detergente neutro y enjuagar con un paño mojado. 4. Colocar todas las partes en la nevera. 5. No desconectar. Desinfección: 1. Realizar una aspersion con alcohol por todo el ambiente de la nevera. 2. Dejar evaporar. 3. Mantener cerrada.				
Observaciones					

Anexo 9.
POES
 Limpieza y
 desinfección de
 recipientes de
 agua destilada

	POES LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN DE RECIPIENTES DE AGUA DESTILADA DEL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN ULP			CÓDIGO	09
				REVISIÓN	
				FECHA	
Preparado por:		Revisado por:		Aprobado por:	
Firma:		Firma		Firma	
1. Objetivo	Garantizar la inocuidad que brinda el agua destilada a todos los procedimientos a realizar dentro del laboratorio.				
2. Frecuencia	Semanal				
3. Materiales y equipos	*Agua * Detergente neutro	* Esponja abrasiva * Papel de secado	* Cepillo de alambre de acero * Toallas de papel desechables		
4. Zonas de limpieza	Zona de lavado				
5. Procedimiento	Limpieza: 1. Desocupar completamente el recipiente principal de agua destilada. 2. Aplicar detergente neutro y con la ayuda de una esponja abrasiva, frotar por todas partes del recipiente. 3. Juagar con abundante agua y verificar que no quede detergente. 4. Repetir el proceso. 5. Desocupar cada uno de los recipientes pequeños de agua destilada. 6. Repetir el proceso anterior, usando además de lo mencionado, un cepillo de alambre de acero para asegurar que entre por la boca del recipiente y limpie todo su interior. 7. Juagar con abundante agua y verificar que no quede detergente.				
Observaciones	No se debe sobrepasar el tiempo de limpieza para evitar el manejo de agua que lleve mucho tiempo recolectada y evitar la proliferación de microorganismos.				