



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de Máster

## en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

**Evaluación cuantitativa del riesgo de *Listeria monocytogenes*  
asociado al consumo de queso**

**Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes*  
associated with cheese consumption**

**Autor/es**

Esther Cardo Gimeno

**Director/es**

M<sup>a</sup> Carmen Rota García

Facultad de Veterinaria

2021

---



## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	3
4. OBJETIVOS .....	8
5. METODOLOGÍA .....	9
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	12
6.1. EVALUACIÓN DEL RIESGO .....	12
6.1.1. IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO .....	12
6.1.2. CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO.....	17
6.1.2.1. <i>L. monocytogenes</i> .....	17
6.1.2.2. Listeriosis .....	21
6.1.2.2.1. Patogenia, ciclo intracelular y factores de virulencia.....	21
6.1.2.2.2. Manifestaciones clínicas .....	24
6.1.2.3. Matriz alimentaria .....	26
6.1.2.4. Huésped.....	28
6.1.2.5. Relación dosis-respuesta .....	29
6.1.3. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN .....	30
6.1.3.1. Tamaño de la población .....	31
6.1.3.2. Datos de consumo .....	31
6.1.3.3. Producción de queso .....	32
6.1.3.4. Prevalencia y concentración de <i>L. monocytogenes</i> en el proceso de elaboración del queso .....	34
6.1.3.5. Módulo de evaluación del riesgo MicroHibro® .....	37
6.1.4. CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO .....	39
6.2. VARIABILIDAD E INCERTIDUMBRES.....	40
7. CONCLUSIONES .....	41
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42



## 1. RESUMEN

La listeriosis, causada por la bacteria *Listeria monocytogenes*, es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más graves. A pesar de ser una enfermedad relativamente poco frecuente en comparación con otras zoonosis alimentarias, representa un gran problema de Salud Pública debido a sus elevadas tasas de hospitalización y mortalidad, especialmente entre los grupos de población más susceptibles como son ancianos, inmunodeprimidos, mujeres gestantes, sus fetos y recién nacidos. El carácter ubicuo de este patógeno, junto a las características de crecimiento y supervivencia en condiciones adversas, hacen que sea una preocupación constante en la industria alimentaria. Los alimentos de mayor riesgo son los alimentos listos para el consumo (LPC), entre los que se incluyen productos lácteos como el queso y, en especial, los quesos frescos y de pasta blanda elaborados con leche cruda.

El objetivo planteado en este estudio es realizar una evaluación cuantitativa del riesgo de listeriosis relacionado con el consumo de queso.

Para ello, se ha llevado a cabo una descripción detallada de todas las fases que incluye una evaluación del riesgo: identificación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo, mediante revisión bibliográfica en diferentes bases de datos científicas. Finalmente, para la cuantificación del riesgo de listeriosis asociada al consumo de queso se ha utilizado el software MicroHibro®. Esta herramienta ha permitido estimar el riesgo de consumo de una porción de queso elaborado con leche cruda tanto en población susceptible como en población no susceptible.

## **2. ABSTRACT**

Listeriosis, caused by the bacterium *Listeria monocytogenes*, is one of the most serious foodborne disease. Despite being a relatively rare illness compared to other foodborne zoonoses, it represents a major Public Health problem due to its high hospitalisation and mortality rates, especially among the most susceptible population groups such as elderly, immunocompromised, pregnant women, their foetuses and newborns. The ubiquitous nature of this pathogen, in addition to its growth and survival characteristics under adverse conditions, makes it a constant concern in food industry. An important source of infection is consumption of ready-to-eat (RTE) products, including dairy products such as cheese and especially fresh and soft cheese made from raw milk.

The aim of the present study is to perform a quantitative risk assessment of listeriosis related to cheese consumption.

For this purpose, a detailed description of all the phases involved in risk assessment has been carried out: hazard identification, hazard characterisation, exposure assessment and risk characterisation, by means of a bibliographic review in different scientific databases. Finally, MicroHibro® software was used to quantify the risk of listeriosis associated with cheese consumption. This tool has allowed the estimation of the risk of listeriosis by consuming a portion of cheese made from raw milk in both, susceptible and non-susceptible population.

### 3. INTRODUCCIÓN

Los riesgos derivados de la contaminación de los alimentos por agentes microbiológicos constituyen un problema grave para la salud humana, por lo que, son motivo de preocupación para el sector alimentario y para los organismos gubernamentales y agencias de Salud Pública (FAO/OMS, 1997).

Durante las últimas décadas, la mayoría de los países han registrado un importante aumento en la incidencia de enfermedades provocadas por la presencia de microorganismos en los alimentos. El creciente número de patógenos emergentes, los cambios de virulencia de patógenos conocidos y la aparición de resistencias a los antibióticos han puesto de manifiesto el riesgo potencial de enfermedad al que están expuestos los consumidores (Schirone *et al.*, 2017). De esta forma, la seguridad alimentaria se ha convertido en uno de los principales objetivos para garantizar la Salud Pública. En consecuencia, las medidas de prevención y control de los riesgos a lo largo de la cadena alimentaria contribuyen a garantizar alimentos inocuos y de alta calidad para satisfacer las demandas de los consumidores. En este ámbito, *Listeria monocytogenes* destaca como uno de los principales agentes patógenos de transmisión alimentaria.

*L. monocytogenes* es una bacteria causante de la listeriosis y cuya principal vía de transmisión es a través de los alimentos contaminados. Se trata de una enfermedad relativamente poco frecuente en comparación con otras zoonosis alimentarias, sin embargo, presenta elevadas tasas de hospitalización y mortalidad en colectivos susceptibles, en los que se incluyen ancianos, personas con sistemas inmunológicos debilitados, mujeres gestantes, sus fetos y recién nacidos (FAO/OMS, 2004).

*L. monocytogenes* se caracteriza por ser una bacteria psicrótrofa, anaerobia facultativa, por su tolerancia a la acidez y capacidad de supervivencia a baja actividad de agua y altas concentraciones de sal; además, de su capacidad de formación de *biofilms* en las superficies de equipos y utensilios de la industria alimentaria. Todos estos factores en conjunto favorecen el carácter ubicuo de este microorganismo y, es por ello que, se puede encontrar en multitud de alimentos (pescado y marisco, carne y productos cárnicos, leche y productos lácteos, vegetales, etcétera). Sin embargo, los alimentos más frecuentemente asociados son los alimentos LPC (listos para el consumo).

El Reglamento (CE) nº 2073/2005, establece los criterios microbiológicos de seguridad e higiene alimentaria aplicables a los productos alimenticios que deben cumplir los operadores de empresas alimentarias del Espacio Económico Europeo. Este reglamento define los alimentos LPC como «alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos». En el anexo A de este trabajo, se detallan los criterios de seguridad alimentaria para *L. monocytogenes* en los alimentos LPC (no destinados a lactantes).

En esta categoría de alimentos se incluyen: carnes y productos de la pesca crudos, curados o ahumados en frío, patés, embutidos cocidos y curados, frutas y verduras crudas, leche y otros derivados lácteos, en especial el queso (ELIKA, 2021).

Algunos alimentos LPC no incluyen un tratamiento durante el proceso de elaboración que elimine *L. monocytogenes*, por lo tanto, la seguridad de los mismos dependerá de las medidas aplicadas durante toda la cadena alimentaria para reducir al mínimo la contaminación y limitar la proliferación. No obstante, muchos otros alimentos LPC incluyen una fase que en la cual se elimina *L. monocytogenes* mediante algún tipo de tratamiento, en general térmico (por ejemplo, pasterización), pero, a pesar de ello, la presencia de esta bacteria en estos productos está comúnmente relacionada con la recontaminación de los mismos en etapas previas al envasado final o con la manipulación posterior durante su comercialización.

Por otra parte, existen alimentos LPC que debido a sus características no pueden favorecer el desarrollo *L. monocytogenes*, es decir, aquellos que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final) (AESAN, 2019). Pertenecen también a este grupo los productos con  $\text{pH} \leq 4,4$  o  $a_w \leq 0,92$ , los productos con  $\text{pH} \leq 5,0$  y  $a_w \leq 0,94$ , y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a este grupo, siempre que se justifique científicamente (Reglamento (CE) nº 2073/2005).



A pesar de la aplicación de estos criterios de seguridad alimentaria, se ha observado una tendencia creciente de prevalencia y concentración de *L. monocytogenes* en los alimentos LPC, sobre todo aquellos de venta al por menor. En el periodo 2010-2011, a nivel de la Unión Europea se confirmaron recuentos superiores a 100 ufc/g al final de la vida útil del queso con una prevalencia de 0,06 %. Mientras que, en 2019, la prevalencia de *L. monocytogenes* se encontraba en 0,9 % para este alimento (EFSA/ECDC, 2021). Estos datos muestran el incremento en la prevalencia de *L. monocytogenes* durante los últimos años, siendo el queso uno de los alimentos LPC de mayor riesgo.

El Real Decreto 1113/2006 define el queso como el producto fresco o madurado, sólido o semisólido, obtenido de la leche, de la leche total o parcialmente desnatada, de la nata, del suero de mantequilla o de una mezcla de algunos o de todos estos productos, coagulados total o parcialmente por la acción del cuajo u otros coagulantes apropiados, antes del desuerado o después de la eliminación parcial de la parte acuosa, con o sin hidrólisis previa de la lactosa, siempre que la relación entre la caseína y las proteínas séricas sea igual o superior a la de la leche.

Los quesos son alimentos de base láctea que se producen y consumen ampliamente en todo el mundo. La complejidad de este alimento viene dada por la gran variedad de tipos que existen, ya que el origen de la leche, otros ingredientes o aditivos añadidos, las diferentes formas de producción y aspectos tecnológicos confieren a cada queso unas características únicas. Dependiendo de las mismas, el crecimiento de microorganismos, varía de forma considerable (Possas, Bonilla-Luque y Valero, 2021).

Para evaluar el riesgo de peligros alimentarios, tanto de naturaleza biológica como química, las políticas de Seguridad Alimentaria se basan en el establecimiento de la herramienta de Análisis de Riesgos, que permite evaluar el riesgo para la salud humana derivado de un agente de peligro, la gestión y la comunicación del mismo a las partes interesadas.

En el Reglamento (CE) nº 178/2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. En dicho reglamento se definen los tres elementos que componen el Análisis del Riesgo:

- Determinación del riesgo: proceso con fundamento científico formado por cuatro etapas: identificación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo. La Determinación del riesgo en la literatura científica, generalmente, se encuentra como Evaluación del Riesgo, por lo tanto, será el término empleado a lo largo del presente trabajo.

Esta evaluación puede desarrollarse mediante metodología cualitativa y/o cuantitativa:

-Cualitativa: es una evaluación del riesgo basada en datos que, a pesar de no constituir una base suficiente para cálculos numéricos del riesgo, permiten, si se cuenta con un conocimiento previo de expertos y una identificación de las incertidumbres que conllevan, establecer una clasificación de los riesgos según su gravedad o separarlos en categorías descriptivas.

-Cuantitativa: es una evaluación del riesgo que ofrece expresiones numéricas del mismo para cuantificar de manera más precisa el riesgo, así como una indicación de las incertidumbres asociadas al proceso.

- Gestión del riesgo: proceso consistente en sopesar las alternativas políticas en consulta con las partes interesadas, teniendo en cuenta la determinación del riesgo y otros factores pertinentes, y, si es necesario, seleccionando las opciones apropiadas de prevención y control.

- Comunicación del riesgo: intercambio interactivo, a lo largo de todo el proceso de análisis del riesgo, de información y opiniones en relación con los factores de peligro y los riesgos, los factores relacionados con el riesgo y las percepciones del riesgo, que se establece entre los responsables de la evaluación y los responsables de la gestión del riesgo, los consumidores, las empresas alimentarias y de piensos, la comunidad científica y otras partes interesadas; en ese intercambio está incluida la explicación de los resultados de la evaluación del riesgo y la motivación de las decisiones relacionadas con la gestión del riesgo.

La primera fase del proceso Análisis del Riesgo es la Evaluación del Riesgo, que incluye cuatro etapas diferentes descritas por la FAO/OMS (1997):

-Identificación del peligro: determinación de los agentes biológicos, químicos y físicos capaces de causar efectos adversos para la salud y que pueden estar presentes en un alimento o grupo de alimentos en particular.

-Caracterización del peligro: evaluación de la naturaleza de los efectos nocivos para la salud asociados con el peligro en cuestión. Para los fines de la evaluación de riesgos microbiológicos, son objeto de interés los microorganismos y/o sus toxinas.

-Evaluación de la exposición: evaluación de la ingestión probable de agentes biológicos, químicos y físicos mediante los alimentos, así como de la exposición procedente de otras fuentes, cuando proceda.

-Caracterización del riesgo: proceso de determinación de la estimación cualitativa y/o cuantitativa, incluidas las incertidumbres que conlleva, de la probabilidad de aparición y gravedad de efectos adversos conocidos o potenciales para la salud de una población dada, sobre la base de la identificación del peligro, la caracterización del mismo y la evaluación de la exposición.

La evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos (QMRA por sus siglas en inglés *Quantitative Microbial Risk Assessment*) es un enfoque de modelado matemático que se utiliza para estimar el riesgo de infección/intoxicación cuando una población está expuesta a determinados microorganismos. El proceso implica una descripción cuantitativa de la respuesta microbiana ante las diferentes condiciones encontradas durante todo el proceso de producción y vida útil del producto basado en modelos matemáticos. Sin embargo, se trata de un sistema estocástico y, por ello, es esencial incluir la incertidumbre y la variabilidad en su análisis (EFSA, 2020).

Estos modelos microbiológicos predictivos son una herramienta extremadamente útil para la gestión de la seguridad alimentaria y la estimación de la vida útil de los alimentos. Los modelos matemáticos que describen cuantitativamente el efecto combinado de los factores ambientales en el comportamiento microbiano pueden utilizarse para predecir el crecimiento o la inactivación de los microorganismos. De esta manera, la seguridad alimentaria depende de estos estudios y el desarrollo de los mismos constituye una base valiosa para la toma de decisiones en la fase posterior al análisis del riesgo, la gestión del riesgo, en la que se implementarán medidas de control con el fin de proteger la calidad microbiológica de los alimentos, importante tanto para la seguridad alimentaria como para la calidad del producto (Schvartzman *et al.*, 2011).

La QMRA es un gran reto, ya que son muchos los factores que influyen en la misma, si bien es de gran importancia de cara a su gestión. Los avances en técnicas de detección y cuantificación microbiana, así como un mejor conocimiento sobre el comportamiento de los mismos, ha hecho que desarrollen herramientas para la cuantificación de riesgos microbiológicos. Los métodos cuantitativos publicados por la EFSA para la evaluación del riesgo son: *Swift Quantitative Microbiological Risk Assessment* (sQMRA), FDA-iRISK y la herramienta MicroHibro® (EFSA, 2015).

El software MicroHibro® es una herramienta de microbiología predictiva y de evaluación cuantitativa del riesgo. Este software, desarrollado por la Universidad de Córdoba (España) en colaboración con Optimum Quality (empresa spin-off de desarrollo de software situada en el Parque Tecnológico de Córdoba, España), permite evaluar la evolución de patógenos potenciales y microorganismos alterantes a lo largo de la cadena alimentaria, proporcionando estimaciones para el nivel de exposición y el riesgo asociado a un producto alimentario. MicroHibro® se basa en los datos de prevalencia y concentración de los microorganismos en el punto de partida de la evaluación de riesgos y utiliza la contaminación cruzada, el crecimiento, la supervivencia, las tasas de intervención y la dosis-respuesta como variables clave que afectarían al resultado del modelo (Cubero González *et al.*, 2019).

#### 4. OBJETIVOS

Por todo lo planteado anteriormente, el **objetivo general** que se persigue en este estudio es la realización de la evaluación cuantitativa del riesgo de listeriosis relacionado con el consumo de queso y su impacto en Salud Pública.

Los objetivos parciales son:

- Recopilar y analizar la información científica más reciente sobre el patógeno *L. monocytogenes*, la listeriosis y el queso como producto lácteo listo para el consumo.
- Realizar una descripción detallada de todas las fases de la evaluación del riesgo: identificación del peligro, caracterización del peligro, evaluación de la exposición y caracterización del riesgo.
- Aplicación del software MicroHibro® como herramienta de evaluación cuantitativa del riesgo para la cuantificación del riesgo de listeriosis asociada al consumo de queso.

## 5. METODOLOGÍA

La metodología utilizada para la evaluación del riesgo se basa en la búsqueda de información científica para el desarrollo de cada una de las fases del proceso de evaluación:

- Identificación del peligro: información obtenida de la vigilancia epidemiológica sobre casos y brotes de listeriosis humana por consumo de queso.
- Caracterización del peligro: recopilación de información científica sobre la descripción del agente de peligro (*L. monocytogenes*), de la listeriosis humana, del queso y de la población a la que va dirigido su consumo. Además de búsqueda de información acerca de la relación dosis-repuesta obtenida de datos de estudios experimentales, de la investigación epidemiológica o de opiniones de expertos; así como a partir de modelos matemáticos.
- Evaluación de la exposición: requiere la modelización del procesado del queso, mediante la obtención de datos de prevalencia y concentración, tanto en leche cruda como materia prima, como en cada uno de los eslabones de la cadena de producción de queso. Para ello, se requiere la utilización de modelos predictivos de crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes* durante el procesado del queso y la utilización de bases de datos de consumo de queso en la población en la que se evalúa el riesgo de listeriosis.
- Caracterización del riesgo: requiere de datos de prevalencia y concentración de *L. monocytogenes* en el queso en el momento del consumo, datos de dosis-respuesta, así como datos sobre la población consumidora y frecuencia de consumo de queso.

Para el desarrollo de las dos últimas fases del proceso de evaluación (evaluación de la exposición y caracterización del riesgo) se ha utilizado la herramienta MicroHibro® con el fin de realizar una evaluación de manera cuantitativa.

LA QMRA se ha desarrollado para un tipo de queso elaborado con leche cruda sometido a un proceso de maduración de 60 días. La evaluación comienza con el almacenamiento de la leche en el tanque, justo antes de la elaboración del queso, y termina con el consumo del mismo. Para este tipo de queso se asume que no se ha llevado a cabo la pasteurización de la leche y que la contaminación por *L. monocytogenes* se pudo producir durante el ordeño, el transporte, el almacenamiento en el tanque, en las distintas fases de producción y envasado o en los establecimientos de venta.

El modelo de evaluación del riesgo se compone de cinco módulos: (a) recepción y almacenamiento de la leche cruda, (b) elaboración, (c) maduración, (d) distribución y (e)

venta. Asimismo, para la caracterización del riesgo, se han tenido en cuenta la estimación de la exposición a *L. monocytogenes* (concentración del patógeno por porción y tamaño de la porción) y una función dosis-respuesta (distribución de Poisson) para predecir el riesgo de listeriosis.

Las simulaciones del modelo se realizaron con el software MicroHibro® versión 2.7.2. (Universidad de Córdoba, España). Se realizaron un total de 100 000 iteraciones utilizando la simulación de Monte Carlo para cada escenario.

Por todo ello, la metodología de este Trabajo Fin de Máster se basa en la búsqueda de información científica actualizada de diferentes fuentes como: bases de datos y organismos y agencias nacionales, europeas e internacionales de seguridad alimentaria.

Se realizaron búsquedas en diferentes bases de datos durante el periodo de la revisión transcurrido de enero de 2021 hasta junio de 2021. Las bases de datos consultadas se muestran a continuación:

- Artículos científicos: Web Of Science (WOS), Pubmed, ScienceDirect, Springer y Dialnet.
- Bases de datos de legislación: EUR-Lex
- Agencias y organismos nacionales, europeos e internacionales, principalmente relacionados con la seguridad alimentaria:
  - AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición)
  - CDC (Centers for Disease Control and Prevention)
  - ECDC (European Center for Disease Prevention and Control)
  - EFSA (European Food Safety Authority)
  - ELIKA (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria)
  - EURL Lm (European Union Reference Laboratory *L. monocytogenes*)
  - FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)
  - FSA (Food Standards Agency)
  - IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries)
  - MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación)
  - MICIU (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades)
  - RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed)
  - OMS (Organización Mundial de la Salud)

Las palabras clave utilizadas para la búsqueda de los diversos textos científicos en los que se ha basado este Trabajo Fin de Máster son las siguientes: *Listeria*, *L. monocytogenes*, *ready to eat (RTE)*, *food*, *cheese*, *raw milk*, *microbiological hazards*, *quantitative*, *risk assessment*, *listeriosis*, *predictive microbiology*, *prevalence*, *epidemiology* y *outbreak*. Se han utilizado los nexos “AND” y “OR” entre las diferentes palabras clave.

Los criterios aplicados para la inclusión o exclusión de textos que se han utilizado en esta revisión se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Criterios de inclusión y exclusión.

<b>Criterios de inclusión</b>	<b>Criterios de exclusión</b>
Textos que relacionan <i>Listeria/L. monocytogenes</i>	Textos que no relacionan <i>Listeria/L. monocytogenes</i>
Textos que relacionan <i>ready to eat (RTE)/food/cheese/milk</i>	Textos que no relacionan <i>ready to eat (RTE)/ food/cheese/milk</i>
Textos que relacionan <i>microbiological hazards</i>	Textos que no relacionan <i>microbiological hazards</i>
Textos que relacionan <i>listeriosis</i>	Textos que no relacionan <i>listeriosis</i>
Textos que relacionan <i>risk assessment</i>	Textos que no relacionan <i>risk assessment</i>
Datos de la Unión Europea y/o España	Datos de países no pertenecientes a la Unión Europea

A partir de esta búsqueda, el total de textos científicos seleccionados en las diferentes bases de datos para este Trabajo de Fin de Máster ha sido de 83, los cuales han sido revisados y utilizados para la redacción de esta memoria.

Los textos seleccionados se separan en:

- Casos y brotes de listeriosis a nivel europeo y nacional.
- Caracterización de *L. monocytogenes*, listeriosis y queso.
- Modelos de crecimiento y evaluaciones dosis-respuesta de *L. monocytogenes*.
- Datos de prevalencia y concentración de *L. monocytogenes* en queso, de consumo del alimento y de población susceptible.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

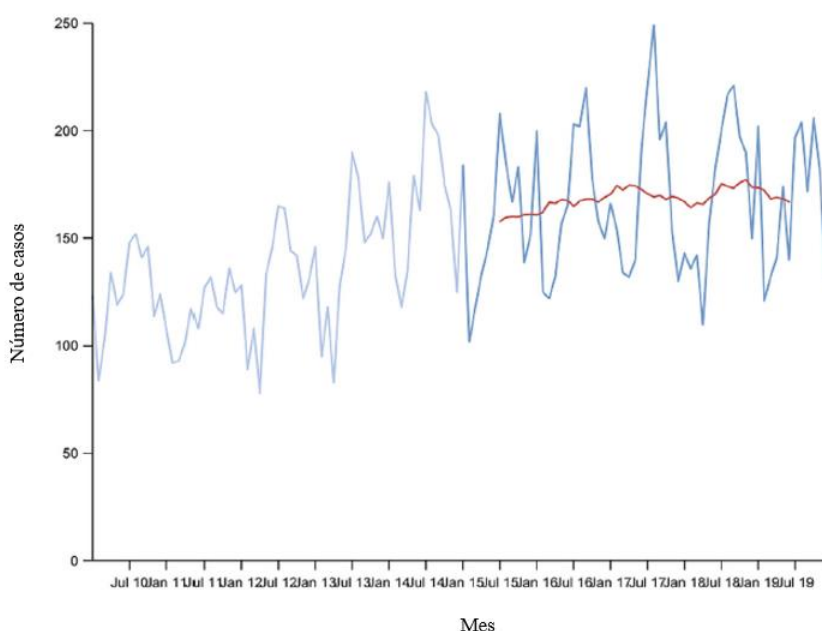
### 6.1. EVALUACIÓN DEL RIESGO

#### 6.1.1. IDENTIFICACIÓN DEL PELIGRO

En esta fase se describen los casos y brotes relacionados con el microorganismo *L. monocytogenes* y se profundiza en aquellos derivados del consumo de queso.

La mayoría de los casos de listeriosis suelen ser esporádicos y los brotes epidémicos suelen ser reducidos y difíciles de investigar. Esto se debe a los periodos de incubación extremadamente variables (3-70 días) y a las formas no invasivas de listeriosis, ya que en muchas ocasiones la sintomatología es leve y no se realizan pruebas de identificación del agente patógeno. Estos factores dificultan el establecimiento de vínculos entre los casos de listeriosis en humanos y los alimentos causales de la misma.

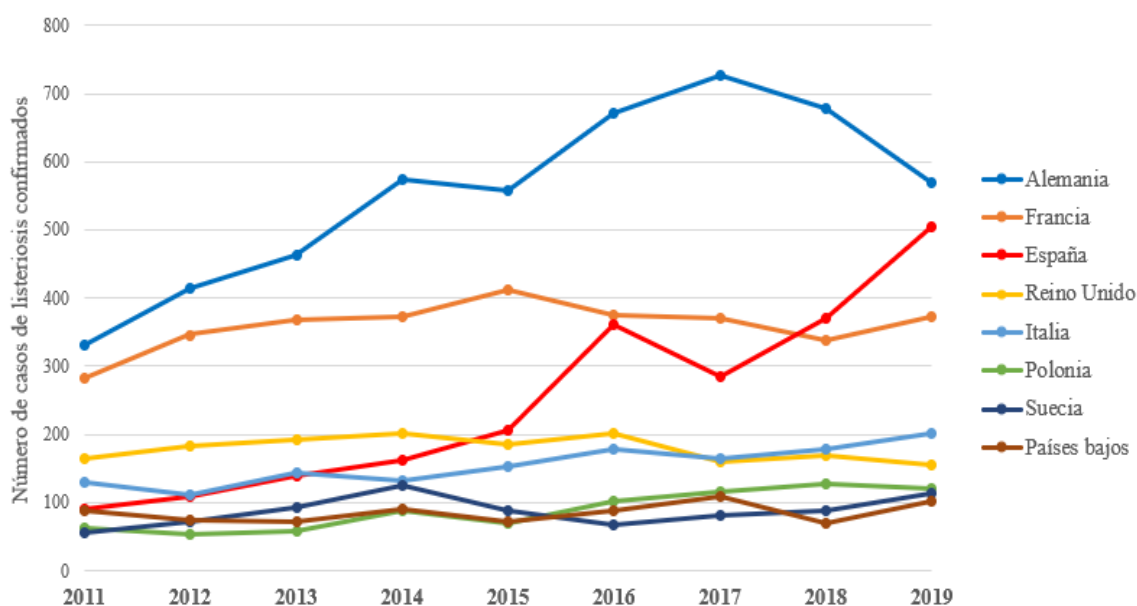
En 2019, se notificaron 2 621 casos confirmados de listeriosis en la Unión Europea, con una tasa de notificación de 0,46 casos por cada 100 000 habitantes, además, el 92,1 % de estos casos fueron hospitalizados. La tendencia ha ido en aumento durante los últimos años, comprobándose, además, que cumple un patrón estacional con repuntes de casos en verano, como se puede observar en la figura 1 (EFSA/ECDC, 2021).



**Figura 1.** Número de casos confirmados de listeriosis notificados por la Unión Europea en 2010-2014 (azul claro), en 2015-2019 (azul oscuro) y una media anual entre 2015 y 2019 (línea roja) (EFSA/ECDC, 2021).



En los últimos diez años, los países europeos con mayor número de casos confirmados de listeriosis son Alemania (25 % del total de casos), Francia (16 %) y España (11 %), como se puede observar en la figura 2.



**Figura 2.** Número de casos de listeriosis confirmados correspondientes a los países de la Unión Europea con mayor número de los mismos durante el periodo de 2011 a 2019 (ECDC, 2021).

Los brotes causados por *L. monocytogenes* en 2019 merecen especial atención, ya que su número ( $n = 21$ ) fue un 50 % mayor en comparación con 2018 ( $n = 14$ ). Este incremento se debió principalmente a los brotes en España, país que notificó 3 brotes, 225 casos, 131 hospitalizaciones y 3 muertes, en comparación con 0 notificados en 2018. La mayoría de estos casos notificados se asociaron a un brote de ámbito comunitario que se consideró uno de los mayores brotes de listeriosis que se han producido en la Unión Europea y que estuvo relacionado con el consumo de carne y productos cárnicos contaminados (EFSA/ECDC, 2021).

La tasa de letalidad en 2019 fue de 17,6 %, lo que evidencia un notable aumento en comparación con los años 2018 y 2017, con porcentajes de letalidad de 13,6 % y 15,6 %, respectivamente. La elevada tasa de mortalidad en comparación con otras enfermedades causadas por patógenos transmitidos por los alimentos (*Salmonella* o *E. coli* O157 con  $< 1$  %) convierte a la listeriosis en una de las enfermedades de transmisión alimentaria más graves de la Unión Europea (EFSA/ECDC, 2021).

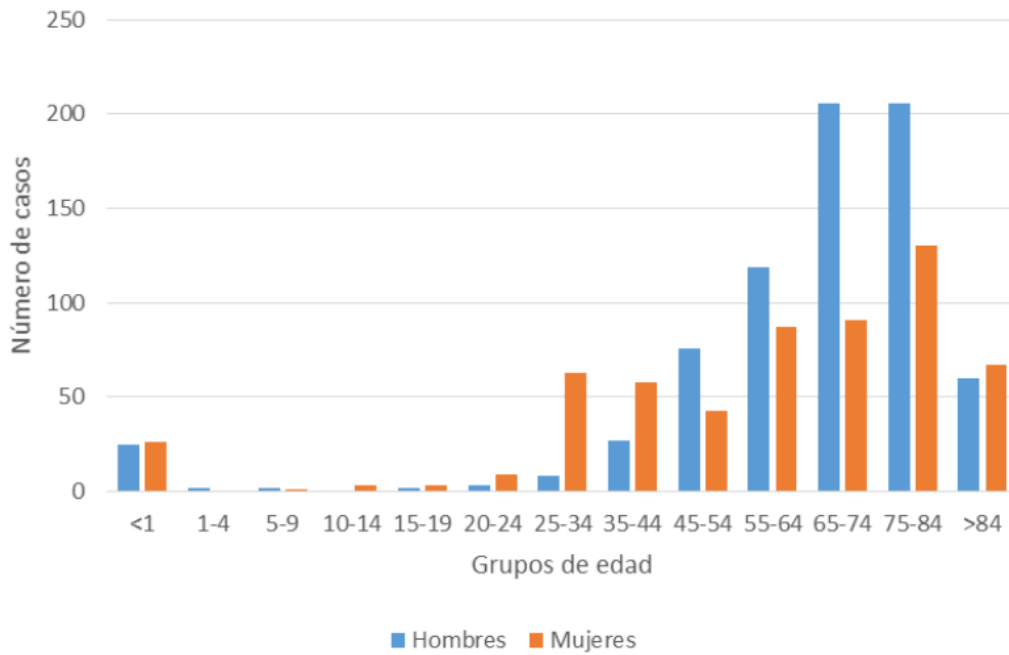
Las infecciones por *L. monocytogenes* se notificaron con mayor frecuencia en el grupo de edad de más de 64 años. La proporción de casos de listeriosis en este grupo ha aumentado de forma paulatina, de manera que se notificaron 56,1 % de los casos en este grupo en 2008, mientras que, en 2019 el porcentaje fue de 64,5 %, siendo especialmente el grupo de edad de más de 84 años el que más aumentó de 7,3 % a 14,3 % en el mismo periodo de tiempo. La letalidad fue del 19,5 % y del 23,0 % en el grupo de edad de 64 a 84 años y de mayores de 84 años, respectivamente (EFSA/ECDC, 2021).

En España, no fue hasta el año 2015 cuando a partir de la Orden Ministerial SSI/445/2015 la listeriosis se incluyó entre las enfermedades de declaración obligatoria en España., de esta forma, se dispone de información de dicha enfermedad gracias a las notificaciones reportadas por las Comunidades Autónomas al Centro Nacional de Epidemiología (CNE) a través de la RENAVE (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica). Con anterioridad estos datos se notificaban también a la RENAVE a través del Sistema de Información Microbiológica (SIM), pero de manera voluntaria (Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo).

Durante el periodo de 2015 a 2018, se notificaron a la RENAVE 1 369 casos confirmados de listeriosis. En este periodo, el número de casos aumentó desde los 256 casos declarados en 2015 a los 432 casos declarados en 2018. Este incremento puede explicarse, en parte, por la paulatina implantación de la vigilancia de esta enfermedad en las Comunidades Autónomas. Las tasas de incidencia fueron crecientes, con 0,64 casos por cada 100 000 habitantes en 2015, 0,95 en 2016, 0,71 en 2017 y 1,06 en 2018, muy superiores a la tasa de incidencia media de la Unión Europea (MICIU, 2019).

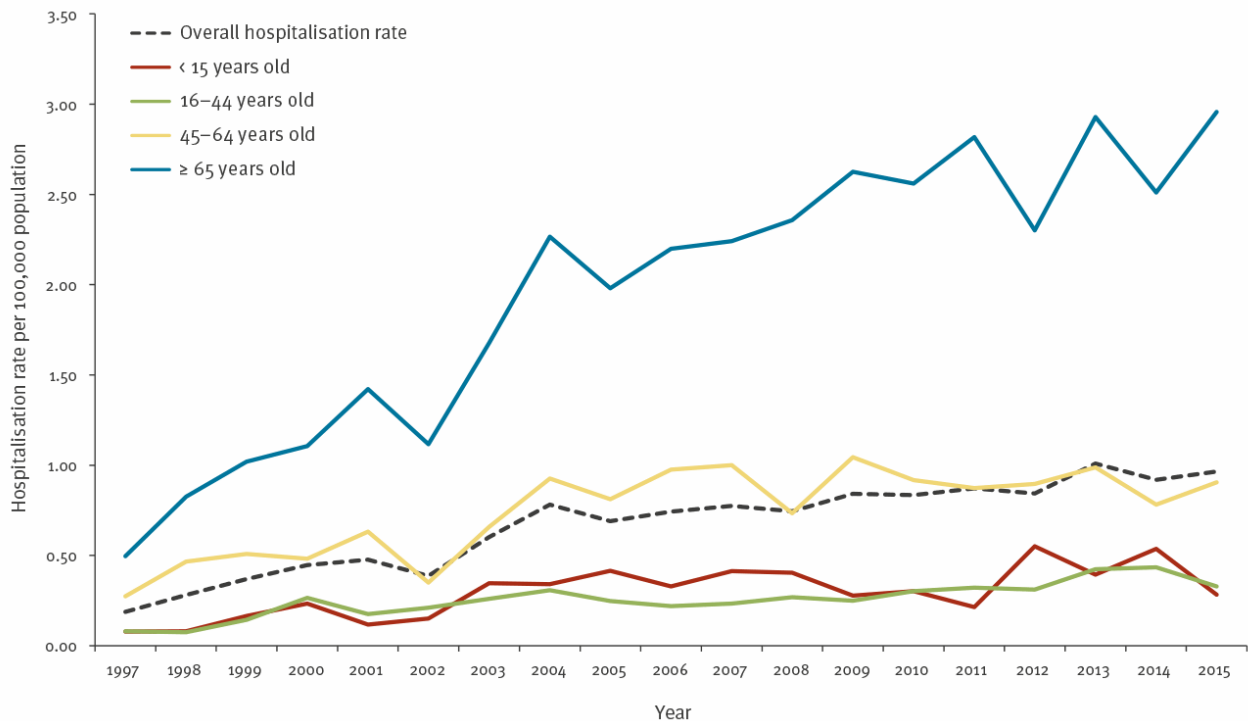
En cuanto a los grupos principalmente afectados, según los datos publicados por la RENAVE en el periodo de 2015 a 2018 (Fig. 3), se puede observar una alta incidencia en menores de 1 año de edad, asociada a la listeriosis perinatal, y en mayores de 64 años.

Estos últimos datos son similares a los de la Unión Europea y pueden deberse al envejecimiento de la población y al aumento en paralelo de la susceptibilidad debido a enfermedades crónicas subyacentes. Los casos notificados con edades comprendidas entre 1 y 24 años son escasos y, a partir de los 25 años, los casos aumentan con la edad. Además, parece existir una ligera diferencia de género, dado que los casos en hombres son superiores en todos los grupos de edad, a excepción de los grupos de 20 a 44 años, que es mayor en mujeres, ligado a la edad fértil y, por tanto, a la situación de embarazo (MICIU, 2019).



**Figura 3.** Casos de listeriosis en España confirmados notificados a la RENAVE según la edad y el sexo durante el periodo 2015-2018 (MICIU, 2019).

Las tasas de hospitalización por cada 100 000 habitantes de cada grupo de edad en España se pueden observar en la figura 4, donde destaca el aumento de 0,5 a 3 en personas mayores de 65 años a lo largo de las últimas dos décadas.



**Figura 4.** Tasas de hospitalización por cada 100 000 habitantes en España según la edad y durante el periodo 1997-2015 (Herrador *et al.*, 2019).

En relación al queso, el número de brotes asociados a su consumo disminuyó notablemente a nivel de la Unión Europea y en todos los Estados Miembro (EFSA/ECDC, 2021). En la tabla 2, se citan algunos de los principales brotes por consumo de queso en la Unión Europea durante los últimos años.

**Tabla 2.** Principales brotes de listeriosis por consumo de queso en la Unión Europea en el periodo de 1995-2018. Adaptado de (Martínez-Ríos y Dalgaard, 2018).

Año	Tipo de queso	Nº de afectados	Nº muertes	Serotipo implicado	País
1995	Queso de untar	37	11	4b	Francia
1997	Queso de untar	14	0	4b	Francia
2001	Queso fresco	>120	0	1/2a	Suecia
2005	Queso Tomme	10	5	1/2a	Suiza
2006	Queso blando	78	13	1/2b	República Checa
2006	Queso	189	26	4b y 1/2b	Alemania
2007	Queso de untar	17	3	-	Noruega
2009	Queso fresco	34	8	1/2a	Austria y Alemania
2011	Queso fresco	7	0	1/2b	Austria y Alemania
2012	Queso fresco	2	0	1/2a	España
2016	Queso	2	0	-	España
2018	Queso de leche cruda de oveja	1	0	-	España

En cuanto a las alertas alimentarias, el RASFF (Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos) es una herramienta clave que garantiza el flujo de información sobre alertas alimentarias y de piensos para permitir una reacción rápida cuando se detectan peligros para la Salud Pública. Los informes anuales del RASFF proporcionan datos sobre las notificaciones que se analizan y presentan por país, tipo de alimento y tipo de peligro en la Unión Europea. En su último informe, en 2019, registraron un total de 40 notificaciones relacionadas con brotes de origen alimentario, de las cuales, 14 de *Salmonella* spp. como agente causal, 11 de *L. monocytogenes* y 7 de norovirus (RASFF, 2019).

La mayoría de las notificaciones del RASFF proceden de alimentos de origen animal, siendo el queso uno de los alimentos más frecuentemente declarados. En el año 2021, de enero a mayo, han sido notificadas 18 alertas alimentarias de *L. monocytogenes* en queso. Las 8 últimas alertas se ven reflejadas en la tabla 3.

**Tabla 3.** Últimas alertas alimentarias por contaminación de queso con *L. monocytogenes* notificadas por el RASFF (RASFF, 2021).

Fecha	Tipo de queso	País
19/03/2021	Queso de leche cruda de vaca	Alemania
01/04/2021	Queso feta	Francia
09/04/2021	Queso de leche cruda de oveja	España
20/04/2021	Queso de cabra	Francia
11/05/2021	Queso azul de leche cruda	Irlanda del Norte
12/05/2021	Queso de leche cruda de cabra	Francia
14/05/2021	Queso	Países Bajos
27/05/2021	Queso de leche cruda de cabra	Francia

Los datos aportados señalan que los quesos que se encuentran principalmente implicados en los casos, brotes y alertas sanitarias son los elaborados con leche cruda, los frescos y los de pasta blanda. Además, estos datos parecen confirmar que los quesos artesanales se contaminan con mayor frecuencia que los quesos procedentes de grandes industrias lácteas. Esto último implica una mejora de la calidad higiénica en relación con el nivel de industrialización (Ibarra-Sánchez, Van Tassell y Miller, 2017).

## 6.1.2. CARACTERIZACIÓN DEL PELIGRO

En esta fase se describe detalladamente el microorganismo y la relación existente entre el mismo, el alimento y el hospedador. De esta manera, se han estudiado los principales factores que influyen sobre la probabilidad de que los individuos de una población contraigan la enfermedad (mecanismos de transmisión de la enfermedad, factores de virulencia, matriz alimentaria...). Asimismo, se hace referencia al modelo dosis-respuesta que permite estimar la probabilidad de padecer la enfermedad en función de la dosis estimada del patógeno en el alimento.

### 6.1.2.1. *L. monocytogenes*

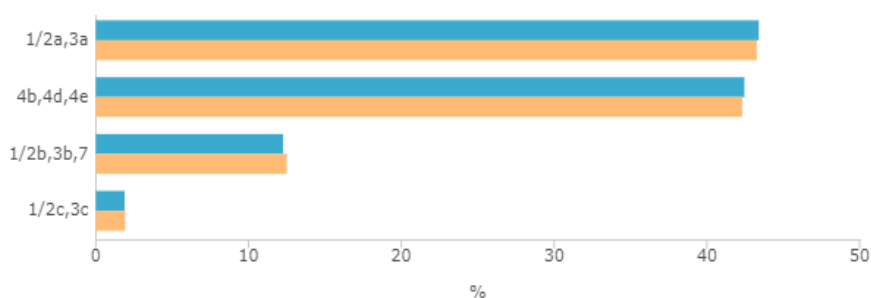
El género *Listeria* es un grupo de bacterias perteneciente a la familia *Listeriaceae*. En la última década este género se ha expandido de tal forma que en la actualidad incluye un total de 23 especies. Hasta 2009, únicamente 6 de ellas habían sido identificadas (*L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii* y *L. grayi*) (Orsi y Wiedmann, 2016).

Sin embargo, a partir de ese mismo año y hasta la fecha, 17 especies más han sido descritas ampliando este género (*L. marthii*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia*, *L. booriae*, *L. costaricensis*, *L. goaensis*, *L. denitrifians*, *L. murrayi*, *L. thailandensis* y *L. valentina*) (Leibniz Institute DSMZ, 2021).

Únicamente dos de estas especies se consideran patógenas, *L. monocytogenes*, patógena para el hombre y los animales, y *L. ivanovii*, que produce infecciones principalmente en animales, entre los que destacan los bóvidos y los pequeños rumiantes (Leclercq *et al.*, 2014).

*L. monocytogenes*, es un bacilo pequeño, regular y corto con extremos romos de aproximadamente 0,4 - 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 1 - 1,5  $\mu\text{m}$  de longitud. Esta bacteria puede encontrarse de manera individual o en cadenas cortas, que pueden estar dispuestas en forma de V, Y o en empalizadas. Se trata de un microorganismo móvil a temperaturas entre 20 y 28 °C gracias a flagelos peritricos, con bajo contenido en G+C (37,9 %), que no posee cápsula ni forma esporas (Toledo *et al.*, 2018). *L. monocytogenes* se diferencia de otros géneros como *Streptococcus* spp. o *Enterococcus* spp. y de otras especies de su mismo género gracias a las siguientes características bioquímicas: Gram positiva, hidrólisis de la esculina, catalasa positiva, oxidasa negativa, no produce SH<sub>2</sub>, produce  $\beta$ -hemólisis en placas de agar sangre y fermenta la glucosa, la lactosa y la ramnosa, pero no la xilosa ni el manitol (EURL Lm, 2019).

Actualmente, *L. monocytogenes* se clasifica en 13 serotipos, que pertenecen a cuatro linajes evolutivos, I a IV (Wai *et al.*, 2020). Según su contenido genético, determinado a partir de técnicas moleculares como PCR (Polymerase Chain Reaction) multiplex o PFGE (Electroforesis en Gel de Campo Pulsado), los linajes I, II y III se dividen en cinco grupos filogenéticos (Jamali, Radmehr y Thong, 2013). Estos serogrupos se designan como I.1 (1/2a y 3a), I.2 (1/2c y 3c), II. 1 (4b, 4d y 4e), II.2 (1/2b, 3b y 7) y III (4a y 4c). De estos 13 serotipos, sólo tres (1/2a, 1/2b y 4b) son los responsables del 95% de las de las infecciones en humanos (Li *et al.*, 2021). Los serotipos de *L. monocytogenes* pertenecientes al linaje I y II se han aislado principalmente de casos esporádicos (serotipos 1/2a, 1/2b y 4b), mientras que, los grandes brotes de listeriosis humana se atribuyen principalmente a los serotipos 1/2a y 4b (Lomonaco, Nucera y Filipello, 2015). En la figura 5 se muestra el porcentaje de fallecimientos por listeriosis en 2019, en la Unión Europea y en el Espacio Económico Europeo, en función de los serogrupos implicados.



**Figura 5.** Distribución de las muertes por listeriosis en 2019 en la Unión Europea (naranja) y en el Espacio Económico Europeo (azul) según los serogrupos de *L. monocytogenes* implicados (ECDC, 2021).

Asimismo, *L. monocytogenes* se caracteriza por ser una bacteria psicrótrofa, ya que su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en el rango mesófilo, pero puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Además, destaca por ser anaerobia facultativa, por su tolerancia a la acidez y por su capacidad de supervivencia en medios con baja actividad del agua y altas concentraciones de sal (Bucur *et al.*, 2018).

El conjunto de estas características dota a este microorganismo de gran resistencia ante condiciones adversas, favoreciendo su crecimiento y supervivencia en alimentos y superficies (Tabla 4).

**Tabla 4.** Factores que condicionan el crecimiento y la supervivencia de *L. monocytogenes* (AESAN, 2011).

Parámetro	Crecimiento			Supervivencia
	Mínimo	Óptimo	Máximo	
Temperatura (°C)	-1,5 a 3,0	30 a 37	45	-18
pH	4,2 a 4,3	7	9,5	3,3 a 4,2
Actividad del agua (aw)	0,90 a 0,93	0,99	>0,99	< 0,90
NaCl (%)	< 0,5	0,7	12 a 16	≥ 20

Su resistencia en ambientes abióticos también viene dada por su capacidad para formar *biofilms*. Se trata de comunidades estructuradas de células bacterianas rodeadas por una matriz autoproducida de sustancias poliméricas extracelulares, que incluye exopolisacáridos, proteínas y ADN extracelular (Kadam *et al.*, 2013).

Esta matriz presenta una estructura firme y altamente organizada con células en diferentes estados fisiológicos, que, en su última etapa de desarrollo, son capaces de desprenderse de la matriz en la que están contenidas y dispersarse en el medio ambiente. Los *biofilms* contribuyen a la persistencia del patógeno proporcionando protección, mejorado la disponibilidad de nutrientes y facilitando la adquisición de nuevos rasgos genéticos como, por ejemplo, genes de resistencia a los antibióticos, mediante la transferencia horizontal de éstos. La capacidad de *L. monocytogenes* para adherirse y formar *biofilms* depende en gran medida de la cepa y está influenciada por condiciones externas como temperatura, pH, nutrientes disponibles, sal y material de la superficie (Ferreira *et al.*, 2014).

Además, este microorganismo es capaz de formar *biofilms* a temperaturas de refrigeración, aunque la formación de los mismos aumenta significativamente conforme aumenta la temperatura (Reis-Teixeira, Farias Alves y Pereira de Martinis, 2017). Esta capacidad confiere una ventaja selectiva para la supervivencia bacteriana en condiciones poco favorables, pero su adhesión a las superficies de la industria alimentaria, como acero inoxidable, vidrio o cloruro de polivinilo (PVC) entre otras, representa una gran preocupación, ya que aumenta la probabilidad de contaminación cruzada (Colagiorgi *et al.*, 2017).

Estas características confieren a la bacteria una gran resistencia ambiental y justifican su ubicuidad en el medio ambiente. *L. monocytogenes* se detecta frecuentemente en alimentos, suelo, polvo, agua, efluentes, vegetación en descomposición, pastos, ensilados y tracto gastrointestinal de animales y humanos (ELIKA, 2013). Se estima que entre el 1 % y el 10 % de la población es portadora asintomática fecal o vaginal de esta bacteria (Hernandez-Milian y Payeras-Cifre, 2014). Asimismo, la mastitis en rumiantes causada por este patógeno puede ser otra de las fuentes de contaminación. Pero, sobre todo, preocupa su gran frecuencia de detección en superficies y equipo de la industria agroalimentaria. Algunas fuentes potenciales importantes de contaminación por *L. monocytogenes* están representadas por superficies ambientales como suelo, paredes, superficies, desagües, juntas, etc. Las personas, el aire y los sistemas de limpieza en la industria también pueden servir como fuentes de transmisión (Ferreira *et al.*, 2014).

Además, es importante mencionar la tolerancia creciente de *L. monocytogenes* a desinfectantes de uso habitual en la industria alimentaria (compuestos de amonio cuaternario, peróxido de hidrógeno, aminas terciarias, alcoholes, cloro y sus derivados, entre otros). Los desinfectantes son sustancias químicas con actividad letal frente a microorganismos y son utilizados continuamente sobre superficies, equipos y utensilios del entorno. Sin embargo, su uso generalizado e inadecuado, así como tiempo insuficiente de contacto, uso de concentraciones subletales o reducidas e inexistentes rotaciones de estos desinfectantes contribuye en gran medida al desarrollo de mecanismos de resistencia (Ferreira *et al.*, 2014).

En relación a la resistencia de esta bacteria a los antibióticos, la mayoría de los aislamientos de *L. monocytogenes* en alimentos, muestras clínicas y ambientales son sensibles a la terapia con antibióticos de uso común (ampicilina, penicilina G, tetraciclinas, etcétera).



Sin embargo, durante los últimos años la incidencia de resistencia a algunos antibióticos entre los aislados de origen alimentario ha ido aumentando. La mayoría de cepas de *L. monocytogenes* presentan resistencia intrínseca frente a cefotaxima, cefepima, fosfomicina, oxacilina y lincosamidas, pero las condiciones de estrés a las que se enfrenta la bacteria en el entorno de procesamiento de alimentos junto con el tratamiento con antibióticos en animales destinados a la producción de alimentos contribuyen al aumento de resistencias (Olaimat *et al.*, 2018).

#### **6.1.2.2. Listeriosis**

La listeriosis es una enfermedad infecciosa cuya vía de transmisión puede ser vertical (madre-hijo), de origen zoonótico (contacto con animales enfermos), nosocomial (adquisición hospitalaria) o por consumo de alimentos contaminados; esta última vía de transmisión representa el 99 % de los casos. Se trata de una enfermedad transmitida por alimentos relativamente poco común que puede afectar a cualquier individuo, pero presenta elevadas tasas de hospitalización y mortalidad (20-30 %) en colectivos especialmente susceptibles, como son ancianos (> 65 años), personas inmunodeprimidas, mujeres gestantes, sus fetos y recién nacidos, comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, por lo que, es objeto de especial atención en Salud Pública (FAO/OMS, 2004).

##### **6.1.2.2.1. Patogenia, ciclo intracelular y factores de virulencia**

Dado que los alimentos contaminados son la principal fuente de infección, la vía de entrada de *L. monocytogenes* en el organismo es oral, a excepción de la transmisión vertical madre-hijo. En el tracto gastrointestinal se produce una invasión de los enterocitos que recubren el epitelio intestinal, es por ello que se trata de un patógeno intracelular facultativo.

Durante las primeras horas tras la ingesta, la bacteria se multiplica en el interior de las células epiteliales intestinales y si el sistema inmune no consigue controlar la infección, la bacteria es capaz de alcanzar el torrente sanguíneo, donde se multiplica en el interior de los macrófagos. En este momento, se produce su diseminación vía hemática y linfática hacia los órganos diana, hígado y bazo, donde también se multiplica en los macrófagos hepáticos y esplénicos, así como en las células epiteliales de dichos órganos (Rodríguez-Auad, 2018).

*L. monocytogenes* activa la respuesta inmune mediada por células T que, bajo la influencia de las citoquinas, atrae a macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y otras células plasmáticas que producen granulomas inflamatorios (Lamont *et al.*, 2011).

Cuando su replicación es restringida por una eficiente respuesta inmune del huésped, *L. monocytogenes* es capaz de evadir los mecanismos de defensa y seguir multiplicándose, por este motivo afecta principalmente a los mencionados grupos de riesgo.

La supervivencia del huésped depende, por lo tanto, del desarrollo de dicha respuesta inmunitaria adaptativa que, en caso de no producirse, puede dar lugar de nuevo a la entrada en el torrente sanguíneo aumentando las probabilidades de atravesar la barrera hematoencefálica y placentaria. De esta forma, la bacteria es capaz de alcanzar el sistema nervioso central y/o la placenta causando infecciones sistémicas potencialmente mortales (Camejo *et al.*, 2011).

El proceso de infección se divide en cinco fases bien diferenciadas, en las cuales están involucrados múltiples factores de virulencia. Las fases de este ciclo son:

1. Adhesión celular: se ha descrito la participación de varios factores de virulencia que permiten establecer contacto con las células del hospedador. Se trata de adhesinas y proteínas de superficie entre las que destacan las proteínas *Ami*, *p60*, *FbpA*, *Lap*, *LapB*, *Vip* e *InlJ*. Por otra parte, se han identificado proteínas adicionales como la proteína *DtlA* o la proteína *CtaP* que contribuyen a la adhesión y virulencia de *L. monocytogenes* (Vera *et al.*, 2013).

2. Invasión celular: las principales proteínas de superficie de *L. monocytogenes* implicadas en la entrada al medio intracelular son las internalina A (*inlA*) y B (*inlB*), codificadas por los genes *inlA* e *inlB*, respectivamente. La *inlA* se une al receptor E-cadherina, glicoproteína localizada en la superficie de las células epiteliales, incluyendo los enterocitos. La interacción entre *inlA* y E-cadherina es crucial para la invasión del epitelio intestinal. Por su parte, la *inlB* interacciona con el receptor transmembrana para el factor de crecimiento de los hepatocitos (receptor Met), esto permite que *L. monocytogenes* se internalice en la célula hospedadora a través de una vacuola fagocítica formada a partir de la membrana de dicha célula (Lecuit, 2020).

3. Escape de la vacuola de internalización gracias a la secreción de listeriolisina O (LLO), y dos fosfolipasas C: PI-PLC (fosfatidilinositol-PLC) y PC-PLC (fosfatidilcolina-PLC), codificadas por los genes *plcA* y *plcB*, respectivamente. La listeriolisina LLO (codificada por el gen *hly*) es una toxina citolítica, hemolítica y formadora de poros necesaria para la liberación de *L. monocytogenes* al citoplasma celular.

La acción sinérgica de las dos fosfolipasas C refuerza la acción de la listeriolisina. Estos factores de virulencia alteran y lisan la membrana vacuolar del fagosoma, promoviendo el paso de la bacteria al citoplasma de la célula hospedadora (Lepe, 2020).

4. Multiplicación intracelular: una vez libre en el citoplasma celular la bacteria expresa genes necesarios para la replicación. En este punto destaca el gen *htp* que codifica una proteína clave para el crecimiento celular óptimo de *L. monocytogenes*. Tras la replicación, comienza un proceso dirigido por la proteína *ActA* que induce la polimerización de filamentos de actina en un polo de la bacteria y promueve el movimiento de la misma en el citoplasma celular (Bierne, Milohanic y Kortebi, 2018).

5. Propagación celular: esta estructura formada por la polimerización de la actina facilita el movimiento intracelular del patógeno y permite la invasión de otras células adyacentes debido a que genera protrusiones en la membrana desde la célula primaria infectada hacia las células cercanas. Las protrusiones en vacuolas de doble membrana (secundarias) son lisadas por las proteínas PC-PLC, PI- PLC y LLO. *L. monocytogenes* se libera al citoplasma celular y se inicia un nuevo ciclo de infección (Camejo *et al.*, 2011).

*L. monocytogenes* se caracteriza por una alta heterogeneidad en la virulencia. La evolución bacteriana ha permitido la adquisición de regiones específicas del cromosoma por parte de la bacteria a través de mecanismos de transferencia genética. Las diferencias en la virulencia entre las cepas se deben a polimorfismos en las secuencias de nucleótidos de los genes debido a mutaciones y/o a la adición o delección de algún gen de virulencia (Fernández González, 2016).

Los genes de virulencia de *L. monocytogenes* se encuentran dentro de regiones del cromosoma conocidas como Islas de Patogenicidad. La región del cromosoma llamada Isla 1 de Patogenicidad de Listeria (LIPI-1, Listeria Pathogenicity Island 1) contiene los genes que codifican los seis principales factores de virulencia (*prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *actA* y *plcB*) responsables del parasitismo intracelular del patógeno.

La expresión de estos genes de virulencia se regula por el producto del primero, la proteína reguladora *PrfA* junto con la expresión de los genes *inlA* e *inlB*, situados en otra zona del cromosoma asociados a islotes genéticos y con el factor sigma alternativo  $\sigma$ B (codificado por el gen *sigB*). En conjunto modulan la transcripción de genes de virulencia, sin embargo, el mecanismo de control mediado por *PrfA* se considera el más importante, ya que es

necesario para la regulación de estos factores de virulencia actuando como activador o represor de los genes durante la transición del patógeno desde el medio ambiente al interior de las células del huésped (Ortiz, 2016).

Asimismo, en algunas cepas de *L. monocytogenes* se ha identificado un nuevo factor de virulencia (listeriolisina S, codificada por el gen *lIs*) localizado en la Isla 3 de Patogenicidad de *Listeria*. El conjunto de todos estos factores convierte a *L. monocytogenes* en un patógeno altamente eficaz, al permitirle la entrada y multiplicación en el interior de las células del huésped y, así, tener la capacidad de evadir el reconocimiento inmunológico.

#### **6.1.2.2.2. Manifestaciones clínicas**

La infección por *L. monocytogenes* tiene dos formas de presentación: listeriosis no invasiva y listeriosis invasiva, siendo la primera la más frecuente. La listeriosis no invasiva es la forma de presentación predominante en la población general. En este grupo se requiere una mayor dosis infectiva para causar enfermedad y la infección suele ser asintomática o provocar un cuadro gastroentérico febril que cursa con vómitos, náuseas, diarrea, fiebre, cefalea, dolores abdominales, escalofríos, fatiga, dolor articular y muscular. Esta forma de presentación suele ser autolimitante y remite de forma espontánea (AESAN, 2009).

La listeriosis invasiva, por otro lado, es la forma de presentación más frecuente en los grupos de población susceptibles, donde la dosis infectiva de *L. monocytogenes* es mucho menor. El período de incubación medio de la listeriosis invasiva es de aproximadamente 8 días, pero con un rango amplio y muy variable (de 3 a 70 días). Esta variabilidad viene dada por la forma clínica en la que se presenta la enfermedad (Goulet *et al.*, 2013).

En la población de mayor riesgo, la listeriosis invasiva tiene principalmente tres presentaciones clínicas: infección del torrente sanguíneo (bacteriemia), infección del sistema nervioso central y listeriosis materno-fetal (Hernandez-Milian y Payeras-Cifre, 2014).

De esta forma, se diferencian los adultos no gestantes (listeriosis no perinatal), en los cuales la infección invasiva o sistémica comúnmente se manifiesta con meningitis o meningoencefalitis (19,4 % de los casos confirmados), debido a que el patógeno alcanza el sistema nervioso central, con o sin bacteriemia, o como bacteriemia únicamente (71,8 % de los casos confirmados).

Estas formas clínicas constituyen más del 80 % de casos en Europa (EFSA, 2018b). La bacteriemia se observa de forma más habitual en personas mayores de 75 años, mientras que la meningitis aparece en el rango de edad, entre los 45 y los 65 años (Lepe, 2020).

Los síntomas clínicos de las infecciones del torrente sanguíneo por *L. monocytogenes* son similares a los de otros agentes etiológicos que causan bacteriemia, como el malestar general, la fiebre y la mialgia. Con frecuencia se observan síntomas como cefalea, dolor abdominal, vómitos y diarrea, que indican que el patógeno se encontraba localizado en el tracto digestivo antes de alcanzar el torrente sanguíneo. La bacteriemia puede progresar y llegar a producir un shock séptico (FAO/WHO, 2004).

*L. monocytogenes* puede producir otras manifestaciones clínicas menos frecuentes que se localizan en órganos concretos. De esta forma, destacan: infecciones cutáneas, conjuntivitis, linfadenitis, absceso cerebral, hepático y/o esplénico, hepatitis, peritonitis, infección pleuropulmonar, pericarditis, miocarditis, artritis y osteomielitis, entre muchas otras (Parrilla Valero, 2011).

Por otro lado, la listeriosis perinatal o materno-fetal, comprende entre el 10 y el 15 % de los casos de listeriosis. Este grupo está formado por mujeres embarazadas y sus fetos o recién nacidos. Las mujeres embarazadas tienen 10 veces más probabilidades de desarrollar la enfermedad tras el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* en comparación con la población general. Esto es debido a que durante el embarazo existe una alteración de la inmunidad celular que favorece la diseminación y entrada vía hematogena del patógeno a la placenta y, por lo tanto, la posterior afectación del feto (Lepe, 2020).

La bacteriemia es la principal manifestación en las mujeres embarazadas, donde la mayoría de ellas experimenta una enfermedad leve similar a la gripe, con síntomas de fiebre dolor de cabeza y mialgias. Estos síntomas pueden preceder a un parto prematuro o aborto séptico.

Las mujeres pueden contraer la enfermedad en cualquier momento durante el embarazo, pero la mayoría de los casos se registran en el tercer trimestre, etapa en la que la inmunidad de los linfocitos T disminuye. La infección en el feto puede ocurrir debido a que la bacteria atraviesa la barrera placentaria o bien debido al paso del feto por el canal del parto (Lepe, 2020).

La listeriosis neonatal se divide en dos formas clínicas. Por un lado, en la infección neonatal de inicio temprano (primera semana de vida) donde los síntomas que presenta el neonato suelen ser cianosis, fiebre, apnea y neumonía, aunque también pueden observarse signos cutáneos como el exantema eritematoso (piogranulomatosis infanto-séptica). Mientras que, por otro lado, en las infecciones de inicio tardío (> 7 días de vida), la manifestación más habitual es la meningitis. El nacimiento de un feto prematuro con listeriosis está asociado a una tasa mortalidad infantil de entre 50 y 90 % (Rodríguez-Auad, 2018).

### **6.1.2.3. Matriz alimentaria**

Actualmente en el mercado, se encuentra disponible una diversa variedad de quesos. Por lo tanto, la clasificación de estos productos es extremadamente difícil. Para ello, se deben tener en cuenta varios parámetros, incluido el origen de la leche (bovino, caprino, ovino, etc.), el tratamiento térmico al que se somete la leche (cruda o pasteurizada) o su maduración. Así como, el uso de un *starter* microbiano, cuajo, la adición de sal u otros ingredientes y/o aditivos y los diferentes parámetros en cada etapa del proceso de elaboración (Almena-Aliste y Mietton, 2014).

La prevalencia y supervivencia de *L. monocytogenes* en el queso han sido objeto de estudio en los últimos años. La leche, como materia prima inicial, puede servir como medio ideal para el crecimiento de patógenos dado el pH, aw y temperatura que presenta, sin embargo, el proceso de acidificación experimentado durante la elaboración del queso puede inhibir el crecimiento microbiano, especialmente en los quesos blandos (Gérard *et al.*, 2018).

Durante la elaboración del queso, las características intrínsecas de la matriz (pH y aw) y los factores externos como temperatura, tiempo de almacenamiento y humedad relativa regirán el comportamiento de los microorganismos, incluidos los patógenos. El dinamismo de estos parámetros en cada tipo de queso hace que el comportamiento microbiano sea muy impredecible.

Todos estos factores son muy variables en función del tipo de queso que se pretenda elaborar. En relación a los factores intrínsecos, el pH final puede ser de 4,2-4,3 en quesos frescos, mientras que, en quesos madurados alcanza valores de 5,1-5,9, e incluso existen excepciones como el Camembert con un pH de 7,4 (Batty, Waite-Cusic y Meunier-Goddik, 2019). Mientras que, la aw, por otro lado, es más baja en quesos muy madurados, llegando a valores de 0,70 y, por el contrario, alcanza valores elevados (0,99) en quesos frescos.

En cuanto a los factores extrínsecos, como la humedad relativa y la temperatura a lo largo del proceso de elaboración del queso también son variables. La humedad oscila en un rango entre 80 y 95 %. Mientras que, la temperatura, en la leche almacenada en el tanque es de 6-8 °C, alcanza valores de 32-34 °C para que se produzca la coagulación y finalmente los valores durante la maduración (8-12 °C) y almacenamiento para su posterior conservación (4-12 °C) dependerán del tipo de queso.

La microestructura de la matriz alimentaria también puede afectar al crecimiento de los microorganismos imponiendo restricciones físicas, las cuales impiden la difusión de nutrientes y productos metabólicos y limitan la disponibilidad de oxígeno. Las bacterias pueden agotar los recursos en su área circundante, lo que conlleva una reducción en la tasa de crecimiento o incluso una fase de retraso adicional si el estrés ejercido es severo (Aspridou *et al.*, 2014).

Sumado a lo anterior, la presencia de microbiota competitiva es un factor agregado que puede afectar al crecimiento. La microbiota presente en el queso (bacterias endógenas de la leche y bacterias utilizadas como cultivo iniciador) destaca por su capacidad de inhibición de microorganismos patógenos, como *L. monocytogenes*. Este modelo de competencia se denomina efecto Jameson (Gonzales-Barron *et al.*, 2020). En concreto, las LAB (bacterias ácido lácticas) destacan por su efecto antagónico que se debe principalmente a la disminución del pH del alimento, la competencia por los nutrientes existentes en la matriz y la producción de metabolitos inhibidores. Las LAB son capaces de producir sustancias con actividad antimicrobiana como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas (Kasra-Kermanshahi y Mobarak-Qamsari, 2015).

Asimismo, la matriz alimentaria también puede afectar a la supervivencia del patógeno en el ácido gástrico y, por tanto, a la susceptibilidad de la infección. La neutralización del ácido estomacal por parte de los alimentos, la reducción de la secreción de ácido y de los tiempos de tránsito o la protección del patógeno debido a alto contenido graso del alimento, pueden afectar a la dosis requerida para presentarse como enfermedad (FSA, 2014).

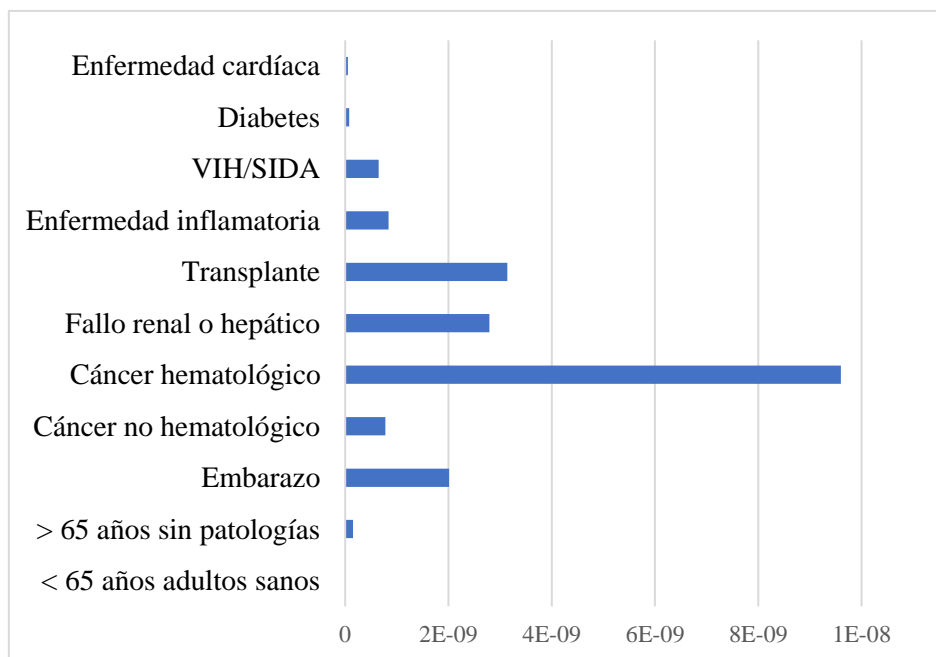
Finalmente, es necesario destacar que, en la Unión Europea se permite la elaboración de quesos con leche cruda siempre y cuando se cumplan los requisitos sanitarios exigidos en el Reglamento (CE) n° 853/2004, por el que se establecen normas higiénicas específicas para los alimentos de origen animal (Anexo B).

Sin embargo, la contaminación del queso por *L. monocytogenes* no es específica de los quesos elaborados con leche cruda, ya que los quesos elaborados con leche pasteurizada pueden contaminarse debido a una pasteurización inadecuada o contaminación posterior (Martínez- Ríos y Dalgaard, 2018).

#### 6.1.2.4. Huésped

La listeriosis puede afectar a cualquier grupo de edad, pero la forma invasiva de esta enfermedad se atribuye a los grupos de población susceptibles. En este grupo se incluyen personas mayores de 65 años; mujeres embarazadas y sus fetos o recién nacidos; niños menores de un año; personas con afecciones inmunosupresoras subyacentes preexistentes que deterioran su sistema inmunitario, como cáncer, diabetes, VIH/SIDA y pacientes trasplantados, entre otros (Mateus *et al.*, 2013).

En la figura 6 podemos observar la probabilidad de adquirir listeriosis en función al grupo de riesgo, siendo los enfermos de cáncer, seguido de personas trasplantadas los de mayor riesgo. La distribución (log normal-Poisson) se realiza según la media de la estimación de  $r$  (probabilidad de presentar listeriosis invasiva tras la ingestión de una célula de *L. monocytogenes*), variable que depende de la población, ya que refleja su susceptibilidad (Pouillot *et al.*, 2015).



**Figura 6.** Distribución (log normal-Poisson) de 11 subgrupos de población según la media de la estimación de  $r$  (Pouillot *et al.*, 2015).



### 6.1.2.5. Relación dosis-respuesta

La evaluación dosis-respuesta pretende relacionar la dosis ingerida por un individuo, población general o grupo poblacional con la probabilidad de producirse la enfermedad.

La dosis infectiva mínima de *L. monocytogenes* capaz de causar la enfermedad sigue siendo tema de debate entre la comunidad científica, ya que es multifactorial. El cálculo de la dosis infectiva mínima resulta complejo, ya que en casos de listeriosis no invasiva no se suele realizar identificación del patógeno ni contabilizar los casos y, en los casos de listeriosis invasiva, los periodos de incubación son largos y variables. Esto hace que sea extremadamente difícil obtener información precisa de la dosis a partir de datos epidemiológicos humanos. La cepa y patogenicidad bacteriana, la susceptibilidad del huésped y la prevalencia y concentración del patógeno en el alimento son otros factores que aumentan la incertidumbre (Buchanan *et al.*, 2017).

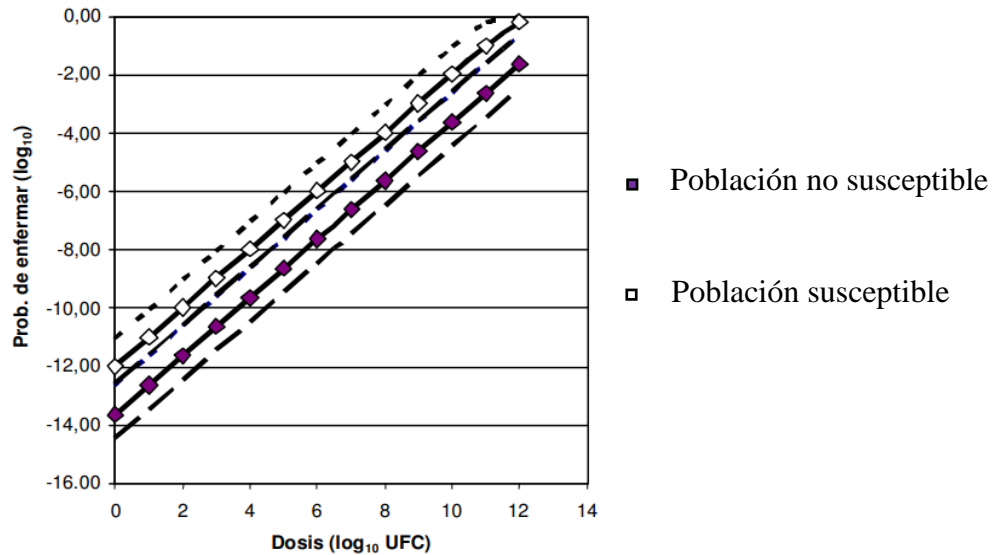
Según el modelo utilizado por la EFSA, el 92 % de los casos de listeriosis invasiva serían atribuibles a dosis superiores a  $10^5$  ufc/porción. Suponiendo un tamaño de porción medio de 100 gramos, esto correspondería a una concentración de *L. monocytogenes* en alimentos LPC superior a  $10^3$  ufc/g en el momento del consumo. No obstante, una pequeña proporción de casos están asociados a niveles más bajos de *L. monocytogenes*,  $10^2$  ufc/g (EFSA, 2018a).

Para el desarrollo de modelos matemáticos de relación dosis-respuesta, generalmente, se asume que tan solo una célula puede iniciar la infección. Esta dosis infecciosa mínima de una célula está asociada con una probabilidad de infección ( $r$ ). Suponiendo que  $r$  es bajo y constante dentro de una subpoblación,  $r$  se puede estimar como la razón del número de casos de listeriosis invasiva en una subpoblación ( $X$ ) por el número estimado de células de *L. monocytogenes* ingeridas por la subpoblación  $D$ . Es decir,  $r = X / D$  (Pouillot *et al.*, 2016).

Esto sugiere que el impacto del estado de salud del consumidor es igualmente importante de considerar como el nivel de *L. monocytogenes* en el alimento ingerido (Pouillot *et al.*, 2015).

Utilizando datos epidemiológicos, la FAO/OMS (2004), mediante un modelo exponencial estimó que la probabilidad de infección después del consumo de una célula de *L. monocytogenes* es del orden de  $r = 5,85 \times 10^{-12}$  para personas susceptibles y de  $5,34 \times 10^{-14}$  para personas no susceptibles (Fig. 7).

Estos valores predicen la aparición de 1 caso de listeriosis por cada 20 millones de exposiciones a  $10^4$  de células de *L. monocytogenes* en la población susceptible y 1 caso de listeriosis por cada 2 mil millones de exposiciones en la población no susceptible. Las  $10^4$  células de *L. monocytogenes* se corresponden a la dosis después de la ingestión de 100 g de producto contaminado con 100 ufc/g (FAO/OMS, 2004).



**Figura 7.** Comparación de las curvas dosis-respuesta de listeriosis en población susceptible y no susceptible (FAO/OMS, 2004).

Con este modelo exponencial se observa que a mayor dosis de *L. monocytogenes* mayor es la probabilidad de desarrollar la enfermedad. Además, se puede apreciar que la probabilidad de desarrollar listeriosis invasiva debido a la ingesta de dosis bajas, es muy reducida. Asimismo, al realizar una distinción entre los tipos de población, se puede observar que las probabilidades de desarrollar listeriosis invasiva siempre son mayores en personas de riesgo que en personas sanas. No obstante, se considera que la única dosis segura de *L. monocytogenes* es cero, incluso para la población no susceptible (Pouillot *et al.*, 2016).

### 6.1.3. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN

En esta fase se evalúa cualitativa y/o cuantitativamente la probabilidad de infección debido a la ingesta de un peligro microbiológico a través de los alimentos. En este trabajo se proporciona una estimación cuantitativa de la prevalencia y la concentración de *L. monocytogenes* en una porción específica del alimento en el momento de consumo.

Para ello se requiere información sobre la cantidad y frecuencia de consumo de queso para una población dada y la probabilidad de esa dosis de causar la enfermedad en la población seleccionada. Además, en esta fase se describe la incertidumbre asociada a la estimación de la exposición.

#### **6.1.3.1. Tamaño de la población**

Como se ha explicado en el apartado de caracterización del peligro, la listeriosis afecta con mayor prevalencia a determinados grupos de población, por lo que, para llevar a cabo la determinación de la población expuesta, se han tomado los últimos datos recogidos por el Instituto Nacional de Estadística sobre la población española y se ha distinguido entre población no susceptible y susceptible. Entre la población susceptible se ha incluido a las personas mayores de 65 años, menores de 4 años y mujeres embarazadas (15-49 años).

A estos datos también se les debería sumar el número de personas inmunodeprimidas, pero es desconocido, por lo que, estamos subestimando el riesgo (García-Béjar Bermejo, 2015).

Los niños o niñas de entre 0-4 años suponen el 4,17 % de la población y las personas con más de 65 años suponen el 19,42 %. A estos porcentajes se les suma el número de mujeres embarazadas, por lo que, para el cálculo de este porcentaje se ha realizado una aproximación con los nacimientos que se produjeron en 2020. Durante este año nacieron 168 047 personas, lo que representa un 0,35 % de la población total (INE, 2021). Estos datos, en su conjunto, indican que al menos el 24 % de la población española es de riesgo, es decir, 11 388 190 de personas.

Finalmente, la población no susceptible está constituida por la población total española menos la población susceptible, por lo tanto, estaría constituida por 36 062 605 personas.

#### **6.1.3.2. Datos de consumo**

La población infantil, entre la que incluimos niños y niñas de 6-35 meses, consumen una media de 53,91 g de queso al día y la frecuencia de consumo más habitual es de 2-3 veces por semana. Los menores de 11 meses consumen requesón, havarti, quesitos, queso de untar y en lonchas, es decir, en su mayoría quesos elaborados con leche pasteurizada. Sin embargo, entre los 12 y los 35 meses el consumo de queso elaborado con leche sin pasteurizar, como, por ejemplo, quesos curados (manchego) o queso parmesano, aumenta (AESAN, 2015b).

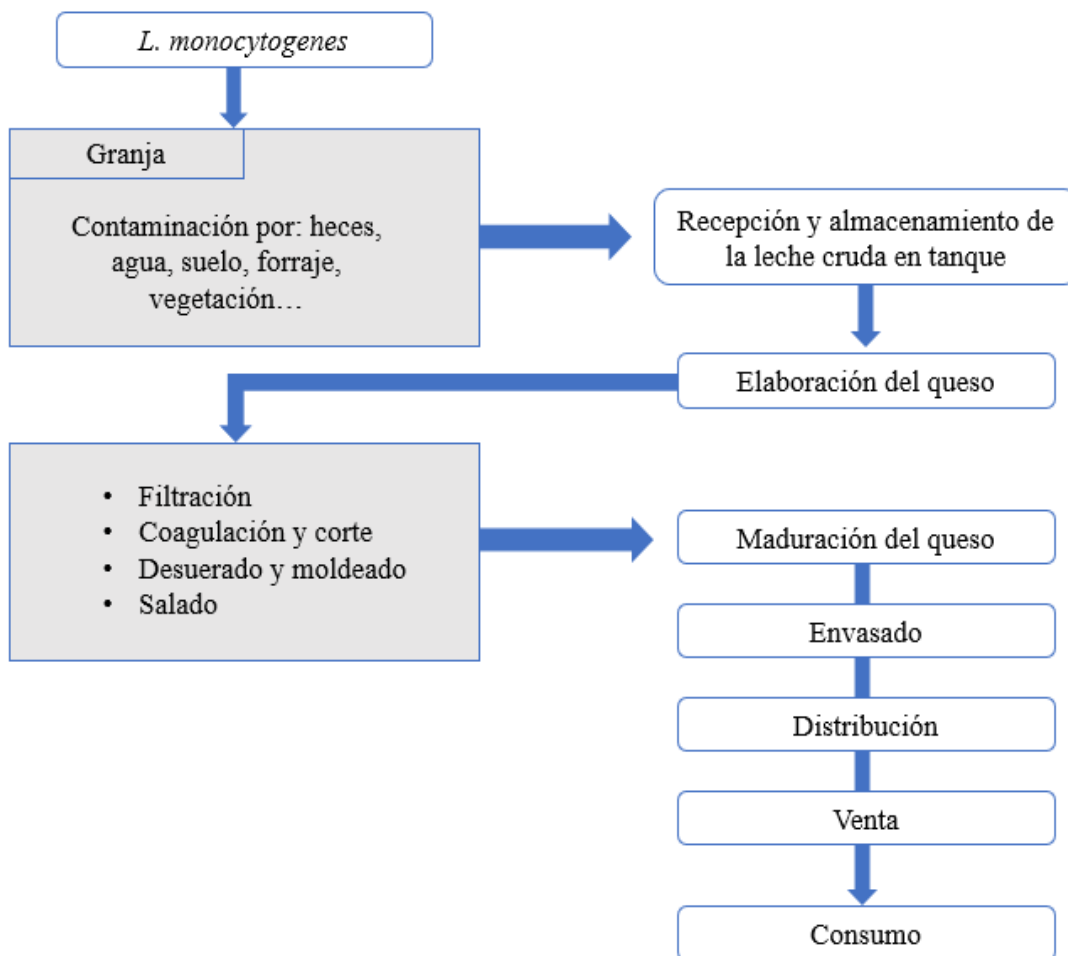
La población mayor de 65 años consume una media de 38,71 g/día y las mujeres embarazadas una media de 31,63 g/día. Según estos datos, la media de consumo de queso de los tres grupos que engloban la población susceptible es de 41,41 g/día (AESAN, 2015c).

Finalmente, la población no susceptible, es decir, niños y niñas de 3 a 17 años y adultos con edades comprendidas entre los 18 y los 64 años consumen una media de 34,44 g/día.

Los datos referidos a la frecuencia de consumo de queso de los grupos de población adulta aún no se encuentran disponibles, por lo que, asumiremos una frecuencia de consumo igual a la de la población infantil.

### 6.1.3.3. Producción de queso

Para una mejor comprensión, en la figura 8 se muestra un diagrama de flujo de la producción de queso de forma general. En quesos elaborados con leche pasteurizada, la pasteurización sería un punto de control crítico (PCC) que tendría lugar tras el almacenamiento de la leche cruda y con anterioridad a la elaboración del queso.



**Figura 8.** Diagrama de flujo esquemático de la producción de queso (Adaptado de Tiwari *et al.*, 2015).

La transmisión de *L. monocytogenes* durante la elaboración, maduración y almacenamiento del queso puede atribuirse a la contaminación directa o a la contaminación cruzada durante cualquiera de estas fases de procesado. La leche cruda se considera la principal fuente de contaminación, no obstante, la capacidad de este patógeno para formar *biofilms* y persistir en las superficies de la industria alimentaria aumenta el riesgo de contaminación cruzada.

En quesos elaborados con leche cruda, los puntos de contaminación por este patógeno incluyen la recepción de la leche cruda y otras materias primas, así como todas las áreas de procesamiento. Asimismo, la contaminación puede deberse a las malas prácticas durante la distribución, durante la venta y una vez se encuentra en los hogares (Possas, Bonilla-Luque y Valero, 2021).

De forma general, las propiedades del queso durante estas fases y las condiciones del obrador (temperatura y humedad) pueden favorecer el crecimiento de este patógeno. Asimismo, si la elaboración se realiza de forma artesanal, las prácticas o la manipulación inadecuada por parte de los operarios durante las fases de coagulación, corte, desuerado, moldeado y salado incrementan considerablemente el riesgo de contaminación.

Si el queso que se elabora es madurado, durante esta etapa se producen una serie de cambios en sus propiedades (físicas, químicas y organolépticas). Se trata de un proceso dinámico y complejo que depende de diversos factores que afectan al desarrollo microbiano (temperatura y el tiempo de almacenamiento, aireación, humedad, sal, pH, aw, microbiota competitiva). En la maduración se asume que debido al descenso del pH y de la aw se produce la inactivación de microorganismos patógenos, sin embargo, no todas las variedades de queso presentan los mismos valores de composición (AESAN, 2015a).

Valero *et al.* (2014) en su estudio sobre la supervivencia de *L. monocytogenes* en queso curado elaborado con leche cruda de oveja confirmó la capacidad de este patógeno de sobrevivir durante el periodo la maduración, pudiendo detectarse en las muestras incluso tras 100 días. Por ello, el informe del Comité Científico de la AESAN, sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de leche cruda y productos lácteos elaborados a base de leche cruda, afirmó que *L. monocytogenes* puede sobrevivir a procesos de maduración de 60 días o más (AESAN, 2015a).

La etapa de envasado debe realizarse en una zona independiente a la de elaboración y, de forma general, las condiciones de esta área (temperatura y humedad) no suelen limitar el crecimiento de *L. monocytogenes*. Durante el envasado, además, la contaminación cruzada puede producirse, especialmente, si el queso se corta para su venta en porciones, debido a la mayor manipulación y contacto con superficies.

Tras esta etapa, el queso se puede transportar a grandes superficies comerciales, tiendas minoristas o de restauración, siendo estas dos últimas de especial interés, ya que favorecen la contaminación debido a la mayor manipulación a la que se somete el alimento. Los envases se abren y manipulan y los establecimientos están abiertos al público.

*L. monocytogenes* como microorganismo ubicuitario se ha detectado con regularidad y a menudo se distribuye ampliamente en estos establecimientos (EFSA, 2018a). El corte del queso en los mismos es un factor clave en la contaminación posterior al procesamiento de los alimentos. Los productos cortados al por menor tienen 1,7 veces más probabilidades de estar asociados con la listeriosis (Ferreira *et al.*, 2014).

Además, el queso también puede contaminarse a nivel doméstico. Las principales causas son la temperatura de almacenamiento del alimento y los envases abiertos que a menudo se almacenan durante períodos prolongados en el refrigerador u otros ambientes de la cocina (Evans y Redmond, 2016).

De esta manera, durante todas las etapas del procesado, el queso elaborado con leche cruda es potencialmente susceptible de contaminarse con *L. monocytogenes* y, si se dan las condiciones adecuadas, el patógeno puede multiplicarse en el alimento.

#### **6.1.3.4. Prevalencia y concentración de *L. monocytogenes* en el proceso de elaboración del queso**

El ganado frecuentemente elimina *L. monocytogenes* al ambiente de la granja a través de sus heces, por lo que, las instalaciones de la misma son un gran reservorio de este patógeno.

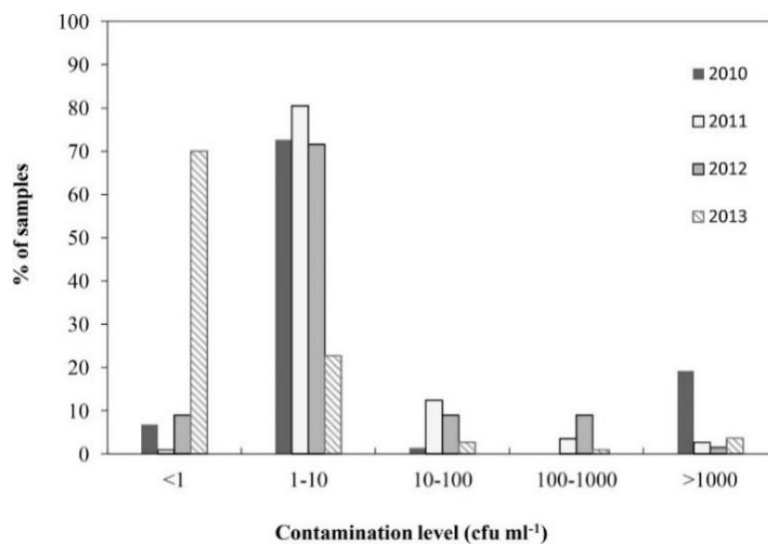
De esta forma, la contaminación puede llegar a la ubre del animal y en consecuencia a la sala de ordeño, donde puede formar *biofilms* y finalmente contaminar la leche cruda, dispersándose en todo el volumen de leche recolectada en el tanque.

La prevalencia y concentración de *L. monocytogenes* en leche cruda obtenida a partir de la bibliografía es muy variable. Un ejemplo es el estudio de Ruusunen *et al.* (2013) en el cual notificaron un 4,9-6,1 % de prevalencia en tanques de granjas finlandesas con concentraciones máximas de 30 ufc/ml en 5,5 % de las muestras de leche cruda (< 1 ufc/ml para el resto de las muestras, 94,5 %).

Otro ejemplo a destacar es el estudio de Castro, Ruusunen y Lindström (2017), en el cual determinaron que la prevalencia de *L. monocytogenes* en tanques de leche cruda oscilaba entre 1,7 % y 4,8 % y su concentración media era de  $\leq 13$  ufc/ml.

Asimismo, el Informe del Comité Científico de la AESAN del 2015 sobre riesgos microbiológicos asociados al consumo de leche cruda y productos lácteos elaborados con leche cruda, establece la frecuencia de presentación de *L. monocytogenes* en leche cruda entre 2,2 y 10,2 % (AESAN, 2015a).

Finalmente, en el estudio de Dalzini *et al.* (2016) sobre la producción de leche cruda en el norte de Italia y su posible contaminación con *L. monocytogenes*, se detectó este patógeno con una prevalencia de 1,66 %. En general, más del 80 % de las muestras contaminadas contenían una concentración baja de *L. monocytogenes* (< 10 ufc/ml) (Fig. 9).



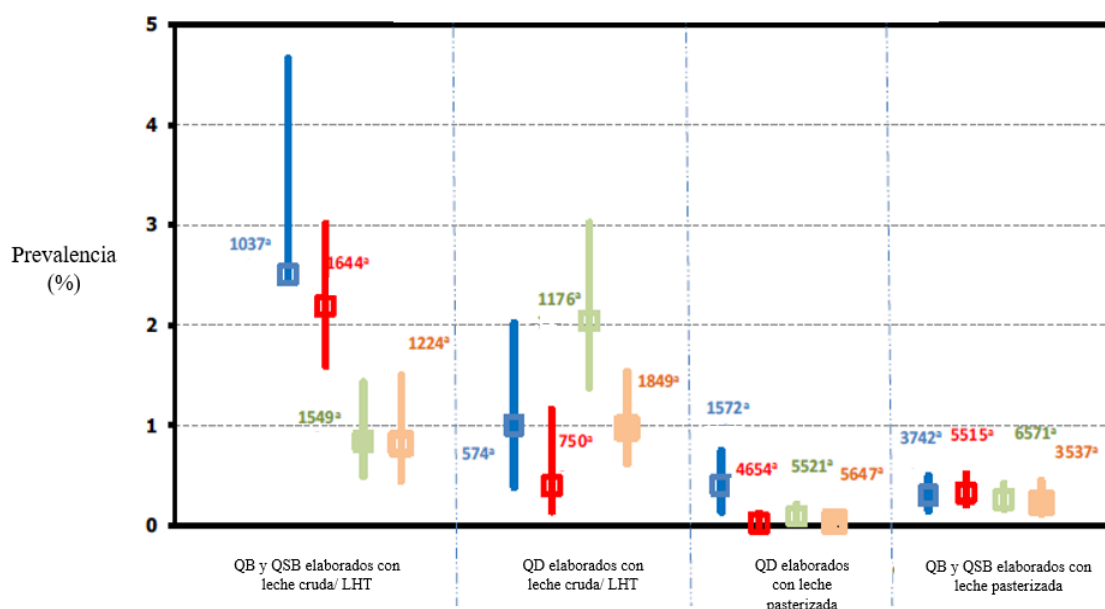
**Figura 9.** Recuentos de *L. monocytogenes* en leche cruda almacenada en tanque según el año de muestreo, expresados como porcentajes de muestras que contienen un número de colonias comprendido entre < 1 y > 1000 ufc/ml (Dalzini *et al.*, 2016)

Los datos anteriores recopilados de diferentes países de Europa subrayan la amplia variabilidad en la prevalencia de *L. monocytogenes*, que puede deberse a varios factores, como el área geográfica, el tamaño explotación ganadera, el tipo de alojamiento para el ganado, su higiene, etcétera.

En relación al queso, la EFSA publicó datos de detección de *L. monocytogenes* en esta matriz procedentes de Macedonia, Montenegro y de otros dieciséis Estados Miembro de la Unión Europea en 2019. La prevalencia media fue del 0,7 % de 9 660 muestras analizadas. La prevalencia en quesos blandos (QB), semiblandos (QSB) y quesos duros (QD) elaborados con leche cruda o tratada a baja temperatura (LHT, *low heat treated*) fue comparable y osciló entre 0,9 y 1 %. La prevalencia de los quesos blandos y semiblandos y de quesos duros elaborados con leche pasteurizada fue de 0,3 % y 0,04 %, respectivamente (EFSA/ECDC, 2021).

En general, considerando el período 2016-2019, se observa una mayor prevalencia del patógeno en los quesos elaborados con leche cruda y LHT (prevalencia media del 1 %) que en los quesos elaborados con leche pasteurizada (prevalencia media del 0,1%).

La proporción de muestras positivas con *L. monocytogenes* para los distintos tipos de queso se representa en la figura 10.



**Figura 10.** Proporción de unidades de muestreo positivas para *L. monocytogenes* (en todas las etapas de muestreo) en quesos en la Unión Europea. Año 2016 (azul), 2017 (rojo), 2018 (verde) y 2019 (naranja) (EFSA/ECDC, 2021).

(a): Número de muestras analizadas.

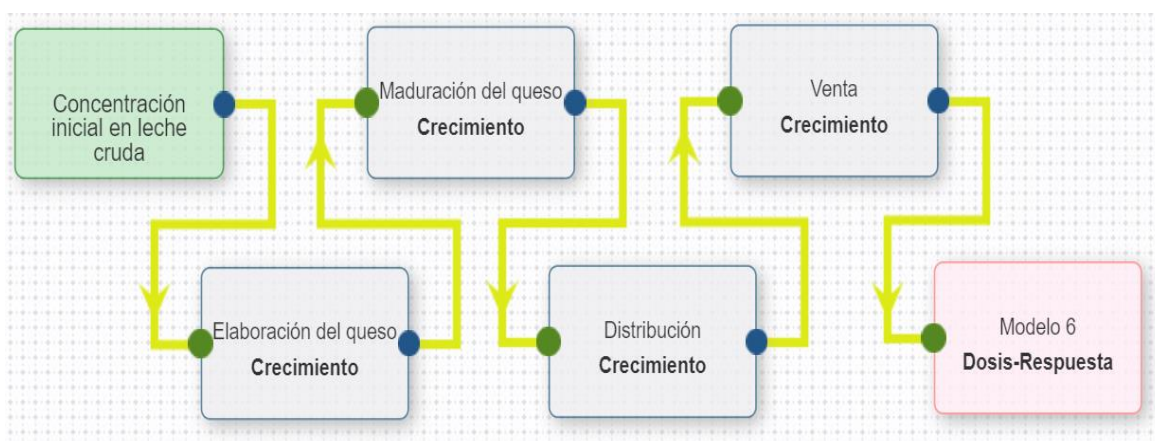


Según las notificaciones de la RASFF durante los años 2008-2016, la concentración de *L. monocytogenes* para la categoría “leche y productos lácteos”, fue superior a 2 log ufc/g en aproximadamente el 65% de los alimentos de esta categoría. La concentración media fue de 2,61 log ufc/g y la concentración máxima de 6,25 log ufc/g (EFSA, 2018a).

### 6.1.3.5. Módulo de evaluación del riesgo MicroHibro®

El software MicroHibro® de la Universidad de Córdoba es la única herramienta desarrollada en España que integra la aplicación de modelos de microbiología predictiva y evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico en alimentos.

En el presente trabajo, para la evaluación del riesgo se ha utilizado el módulo correspondiente de este software. Las diferentes etapas de la cadena de producción del queso hasta el consumo del mismo realizado con la herramienta MicroHibro® se muestran en la figura 11.



**Figura 11.** Diagrama esquemático del modelo de evaluación cuantitativa del riesgo de *L. monocytogenes* a lo largo de la cadena de producción de queso realizado con la herramienta MicroHibro® (Cubero González *et al.*, 2019).

Para la realización de este modelo, se han tomado como referencia los valores de las variables de entrada (*in put*) de la tabla 5 y se han introducido en el módulo de evaluación cuantitativa del riesgo de la herramienta MicroHibro®.

También se indica en la tabla el tipo de distribución (triangular o uniforme) utilizado para cada uno de los parámetros estudiados.

**Tabla 5.** Valores de las variables de entrada de las diferentes etapas de producción del queso en las que se incluye el crecimiento potencial de *L. monocytogenes*.

Etapa	Parámetro	Distribución	Valor	Referencia
<b>Contaminación inicial de la leche cruda</b>	Concentración	Triangular	[0, 1, 2] log ufc/g	(Dalzini <i>et al.</i> , 2016)
	Prevalencia	-	6,2 %	(AESAN, 2015a)
<b>Elaboración</b>	Tiempo	Uniforme	0,5 - 48 h	(Cosciani-Cunico <i>et al.</i> , 2015)
	Temperatura	Uniforme	10 - 32 °C	
<b>Maduración</b>	Tiempo	Uniforme	1368 - 1440 h	
	Temperatura	Uniforme	5 - 6 °C	
<b>Distribución</b>	Tiempo	Uniforme	0,5 - 6 h	(Rosshaug <i>et al.</i> , 2012)
	Temperatura	Triangular	[4, 8,12] °C	
<b>Venta</b>	Tiempo	Uniforme	1104 - 1200 h	
	Temperatura	Uniforme	4 - 10 °C	

Debido a la heterogeneidad de los datos de leche cruda obtenidos, se ha tomado de la bibliografía un valor intermedio de prevalencia de *L. monocytogenes* de 6,2 % (AESAN, 2015a) y la concentración más probable del patógeno, < 2 log ufc/ml (Dalzini *et al.*, 2016).

Respecto a las variables de entrada para la elaboración y maduración, se ha tomado como referencia el artículo de Cosciani-Cunico *et al.* (2015) y para las variables de entrada de distribución y venta del queso, los datos del artículo de (Rosshaug *et al.*, 2012).

De esta forma, planteamos la fabricación de un queso de 1 kg elaborado con leche cruda de vaca con un periodo de maduración de alrededor de 60 días. Este queso, al final de la maduración, presenta unos valores de pH y aw de 5,4 y 0,947, respectivamente, por lo que, puede favorecer el desarrollo de *L. monocytogenes* (Cosciani-Cunico *et al.*, 2015).

Mediante la introducción de estos datos en el módulo de evaluación del riesgo de la herramienta MicroHibro® se ha estimado el riesgo de padecer listeriosis, tanto en población susceptible como en no susceptible.

En este módulo, el modelo de crecimiento microbiano que mejor se ajusta al queso seleccionado es el modelo determinista de Lobacz, Kowalik y Tarczynska (2013), por lo que, se utilizará en todas las fases del proceso de producción.

#### 6.1.4. CARACTERIZACIÓN DEL RIESGO

En esta fase se integran las tres fases anteriores (identificación y caracterización del peligro y evaluación de la exposición) para obtener una estimación del riesgo, es decir, una estimación de la probabilidad y la gravedad de los efectos adversos que se producen en una población determinada con las incertidumbres asociadas.

Los resultados de la evaluación de la exposición se han introducido en el módulo de evaluación del riesgo de la herramienta MicroHibro® para calcular la dosis-respuesta como la probabilidad de contraer listeriosis por consumo de una determinada porción de queso. Los resultados se describen en términos de estimaciones de riesgo por una porción para las poblaciones susceptible y no susceptible.

Para llevar a cabo la estimación de la dosis-respuesta, la herramienta MicroHibro® utiliza un modelo exponencial (distribución de Poisson) basado en la evaluación del riesgo de *L. monocytogenes* en productos LPC realizado por la FAO/WHO en 2004. La ecuación que describe este modelo es:  $P = 1 - e^{(-r * N * S)}$

- $P$  = probabilidad de enfermar.
- $r$  = variable que define la relación dosis/respuesta
- $N$  = dosis ingerida (número de células de *L. monocytogenes* consumidas).
- $S$  (serving) = tamaño de la porción.

Las porciones de queso han sido calculadas en la evaluación de este trabajo, por lo que, para la población susceptible se estima un tamaño de la porción de queso de 41,41 g, mientras que, en la población no susceptible el tamaño es de 34,44 g.

Tras introducir las variables de entrada (Tabla 6) e indicar en el modelo dosis-respuesta el tamaño de la porción consumida por la población a estimar, el software calcula las variables de salida (*out put*).

En población susceptible se estima que el consumo de una porción produciría 0,987 casos. Este dato indica que el consumo de una porción de este tipo de queso sería suficiente para que un individuo de la población susceptible contraiga listeriosis.

En población no susceptible, la variable de salida estima  $8 \times 10^{-6}$  casos por porción, es decir, que serían necesarias 1 000 000 de porciones para producir 8 casos en la población, o, lo que es lo mismo, la ingesta de 125 000 porciones para producir un caso.

De esta forma, un individuo de la población no susceptible debería consumir 4,34 kg (125 000 porciones \* 34,44 g por porción) de este queso para padecer la enfermedad, sin embargo, el consumo de una sola porción (41,41 g) sería suficiente para que un individuo de la población susceptible presente listeriosis.

Según el IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries), este tipo de queso se encontraría dentro de la categoría de riesgo muy alto a riesgo alto (ANEXO C), por lo que, su consumo, especialmente por parte de la población susceptible, debería evitarse.

## **6.2. VARIABILIDAD E INCERTIDUMBRES**

Las herramientas cuantitativas de evaluación del riesgo como el software MicroHibro® permiten estimar con gran precisión el comportamiento microbiano mediante el módulo de microbiología predictiva, así como la probabilidad de enfermar debido al consumo de un alimento contaminado con un determinado patógeno. No obstante, las estimaciones realizadas deben considerarse como una aproximación, por lo que, están sujetas a variabilidad e incertidumbres. La variabilidad e incertidumbres asociadas a esta evaluación de riesgo de listeriosis por consumo de queso en la población susceptible y no susceptible son las siguientes:

- Existencia de gran variabilidad entre los tipos de queso: parámetros de elaboración (temperatura, humedad relativa, tiempo, adición de ingredientes u otros aditivos), efecto de la microbiota competitiva, tipo de maduración, tipo de envasado, etcétera.

- Existencia de variabilidad entre las diferentes cepas de *L. monocytogenes* (mayor o menor virulencia).

- La vigilancia de la listeriosis en la Unión Europea se basa en formas invasivas de *L. monocytogenes*, es decir, no se tienen en cuenta los casos de listeriosis no invasiva. Además, los datos de prevalencia de *L. monocytogenes* en alimentos en la Unión Europea pueden variar según el número de Estados Miembro informantes cada año (EFSA/ECDC, 2021).

- Los datos de prevalencia y concentración de *L. monocytogenes* en leche cruda son elevados, en relación a otros datos encontrados en la bibliografía, por lo que, podríamos estar sobrestimando el riesgo.

-Los datos de consumo de las bases ENALIA y ENALIA 2 corresponden al periodo 2013-2015, sin embargo, el consumo actual de queso en España podría ser muy superior. Además, estos datos incluyen todos los tipos de queso, sin especificar la variedad. Por lo que, puede existir variabilidad dentro de cada subgrupo de población y variabilidad en cuanto a tipo de queso.

-El software MicroHibro® se basa en publicaciones y simulaciones de otros usuarios, por lo que, los modelos están sujetos actualizaciones de manera continua, lo que podría modificar alguno de los parámetros utilizados en la evaluación.

-El módulo de evaluación del riesgo del software MicroHibro® no contempla la posibilidad de transferencia y crecimiento del patógeno de forma simultánea a lo largo de la cadena de elaboración del alimento, por lo que, solo se ha contemplado el peligro de crecimiento y no de contaminación cruzada a lo largo de todo el proceso.

## **7. CONCLUSIONES**

Tras la evaluación del riesgo de listeriosis por consumo de queso, se concluye que:

1. La descripción cualitativa y detallada de cada una de las fases de evaluación del riesgo ha permitido mostrar las incertidumbres a las que está sujeto el riesgo de listeriosis por consumo de queso debido principalmente a la escasez de datos y su elevada variabilidad.
2. La herramienta cuantitativa de evaluación del riesgo MicroHibro® utilizada en este trabajo para la evaluación de la exposición y caracterización del riesgo permite la utilización de distribuciones de datos cuantitativos y simulaciones Monte Carlo, lo que disminuye las incertidumbres asociadas a la evaluación.
3. La aplicación del software MicroHibro® ha permitido estimar que, el consumo de queso, elaborado con leche cruda y madurado durante 60 días, por parte de la población susceptible supone un riesgo muy elevado de contraer listeriosis; demostrando ser muy bajo en la población no susceptible.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2009) *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición: Evaluación del riesgo asociado a la presencia de Listeria monocytogenes en pescado fresco o congelado*. Revista del comité científico, nº 10. Número de referencia: AESAN-2009-008.
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2011) *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición en relación a los estudios de vida útil para Listeria monocytogenes en determinados productos alimenticios*. Revista del Comité Científico, nº 14. Número de referencia: AESAN-2011-003.
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2015a) *Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los riesgos microbiológicos asociados al consumo de leche cruda y productos lácteos elaborados a base de leche cruda*. Número de referencia: AECOSAN-2015-004.
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2015b) *Encuesta Nacional de Alimentación en la población Infantil y Adolescente (ENALIA) 2013-2014. Alimentos y bebidas*. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/enalia.htm#5](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/enalia.htm#5) [Consultado 02-06-2021].
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2015c) *ENALIA 2 Survey. National Food Survey on adults, the elderly and pregnant women*. Disponible en: [https://www.aesan.gob.es/en/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/enalia\\_2.htm](https://www.aesan.gob.es/en/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/enalia_2.htm) [Consultado 02-06-2021].
- AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2019) *Listeriosis*. Disponible en: [http://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/listeria.htm](http://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm). [Consultado 09-05-2021].
- Almena-Aliste, M. y Mietton, B. (2014). “Cheese classification, characterization, and categorization: a global perspective”. *Cheese and Microbes*, pp. 39-71. DOI: 10.1128/9781555818593.ch3
- Aspidou, Z., Moschakis, T., Biliaderis, C. G. y Koutsoumanis, K. P. (2014). “Effect of the substrate’s microstructure on the growth of *Listeria monocytogenes*”. *Food Research International*, 64, pp. 683-691. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.07.031

- Batty, D., Waite-Cusic, J.G. y Meunier-Goddik, L. (2019). "Influence of cheese-making recipes on the composition and characteristics of Camembert-type cheese". *Journal of Dairy Science*, 102(1), pp. 164-176. DOI: 10.3168/jds.2018-14964
- Bierne, H., Milohanic, E. y Kortebe, M. (2018). "To be cytosolic or vacuolar: the double life of *Listeria monocytogenes*". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(136), pp. 1-8. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00136
- Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M, Hayman, M., Jackson, T.C. y Whiting, R.C. (2017). "A review of *Listeria monocytogenes*: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments". *Food Control*, 75, pp. 1-13. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016
- Bucur, F.I., Grigore-Gurgu, L., Crauwels P., Riedel C.U. y Nicolau A.I. (2018). "Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments". *Frontiers in Microbiology*, 9(2700), pp. 1-18. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02700
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S. y Cabanes, D. (2011). "The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle". *Virulence*, 2(5), pp. 379-394. DOI: 10.4161/viru.2.5.17703
- Campagnollo, F.B., Gonzales-Barron, U., Pilão Cadavez, V.A., Sant'Ana, A.S. y Schaffner, D.W. (2018). "Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in traditional Minas cheeses: The cases of artisanal semi-hard and fresh soft cheeses". *Food Control*, 92, pp. 370-379. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.05.019
- Castro, H., Ruusunen, M. y Lindström, M. (2017). "Occurrence and growth of *Listeria monocytogenes* in packaged raw milk". *International Journal of Food Microbiology*, 261, pp. 1-10. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.017
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2018). *Foodborne microbes and illness*. Disponible en: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/foodborne-germs-es.html> [Consultado 09-05-2021].
- Colagiorgi, A., Bruini, I., Di Ciccio, P.A., Zanardi, E., Ghidini, S. y Ianieri, A. (2017). "*Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry". *Pathogens*, 6(3):41, pp. 1-9. DOI: 10.3390/pathogens6030041
- Cosciani-Cunico, E., Dalzini, E., Ducoli, S., Sfamini, C., Bertasi, B., Losio, M. N., Daminelli, P. y Varisco, G. (2015). "Behaviour of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 during the cheese making of traditional raw-milk cheeses from Italian Alps". *Italian Journal of Food Safety*, 4(3):4585, pp. 88-91. DOI: 10.4081/ijfs.2015.4585



- Cubero González, S., Possas, A., Carrasco, E., Valero, A., Bolívar, A., Denisse Posada Izquierdo, G., García-Gimeno, R.M., Zurera, G. y Pérez-Rodríguez, F. (2019). “MicroHibro: A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods”. *International Journal of Food Microbiology*, 290, pp. 226-236. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.007
- Dalzini, E., Bernini, V., Bertasi, B., Daminelli, P., Losio, M.N. y Varisco, G. (2016) “Survey of prevalence and seasonal variability of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk from Northern Italy”. *Food Control*, 60, pp. 466-470. DOI: 10.1016/j.foodcont.2015.08.019
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) (2021). *Disease data from ECDC Surveillance Atlas – listeriosis*. Disponible en: <https://www.ecdc.europa.eu/en/listeriosis/surveillance-and-disease-data/atlas> [Consultado 09-05-2021].
- EFSA (European Food Safety Authority) (2015). “Scientific Opinion on the development of a risk ranking toolbox for the EFSA BIOHAZ Panel”. *EFSA Journal*, 13(1):3939. DOI: 10.2903/j.efsa.2015.3939
- EFSA (European Food Safety Authority) (2018a). “*Listeria monocytogenes* contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU”. *EFSA Journal*, 16(1). DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5134
- EFSA (European Food Safety Authority) (2018b). “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017”. *EFSA Journal*, 16(12):5500. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5500
- EFSA (European Food Safety Authority) (2020). “Training in tools to develop Quantitative Risk Assessment using Spanish ready-to-eat food examples”. *EFSA Journal*, 18, Ed. S1. Número especial: EU - FORA Serie 3. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.e181103
- EFSA/ECDC (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades) (2021). “The European Union One Health 2019 Zoonoses Report”. *EFSA Journal*, 19(2):6406, pp. 78-96. DOI: 10.2903/j.efsa.2021.6406
- ELIKA (Fundación Vasca para la Seguridad Alimentaria) (2021). *Listeria monocytogenes*. Disponible en: <https://seguridadalimentaria.elika.eus/listeria/> [Consultado 09-05-2021].
- EURL Lm (European Unión Reference Laboratory) (2019). *Technical guidance document for conducting shelf-life studies on Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods*. Disponible en: [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety\\_fh\\_mc\\_tech-guide-doc\\_listeria-in-rte-foods\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/biosafety_fh_mc_tech-guide-doc_listeria-in-rte-foods_en.pdf) [Consultado 28-05-2021].



- Evans, E.W. y Redmond, E. (2016). "Older adult consumer knowledge, attitudes, and self-reported storage practices of ready-to-eat food products and risks associated with listeriosis". *Journal of Food Protection*, 79(2), pp.263-272. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-15-312
- FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud) (1997). "Principios y directrices para el establecimiento y la aplicación de criterios microbiológicos para los alimentos". En *Codex Alimentarius. Requisitos Generales (Higiene de los Alimentos)* (2ª ed.) Roma: FAO/OMS.
- FAO/OMS (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y Organización Mundial de la Salud) (2004). "Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods". Roma: FAO/OMS.
- Fernández González, M.P. (2016). *Control microbiológico de Listeria monocytogenes en alimentos para consumo destinado a lactantes*. Universidad de Sevilla. Trabajo de Fin de Grado.
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P. y Stasiewicz M.J. (2014). "*Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for Public Health". *Journal of Food Protection*, 77(1), pp. 150-170. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-150
- FSA (Food Standards Agency) (2014). *Development of an initial report - Reducing the risk of vulnerable groups contracting listeriosis*. Disponible en: <https://www.food.gov.uk/research/research-projects/development-of-an-initial-report-for-reducing-the-risk-of-vulnerable-groups-contracting-listeriosis> [Consultado 31-05-2021].
- García-Béjar Bermejo, B. (2015). *Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en productos cárnicos listos para su consumo en España*. Trabajo de Fin de Máster. Universidad Politécnica de Valencia.
- Gérard, A., El-Hajjaji, S., Niyonzima, E., Daube, G. y Sindic, M. (2018). "Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in various types of cheese—A review". *International Journal of Dairy Technology*, 7(4), pp. 825-843. DOI. 10.1111/1471-0307.12552
- Gonzales-Barron, U., Campagnollo, F.B., Schaffner, D.W., Sant'Ana, A.S. y Cadavez, V.A.P. (2020). "Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence or not of intentionally-added lactic acid bacteria during ripening of artisanal Minas semi-hard cheese". *Food Microbiology*, 91. DOI: 10.1016/j.fm.2020.103545.
- Goulet, V., King, L.A., Vaillant, V. y de Valk, H. (2013). "¿What is the incubation period for listeriosis?" *BMC Infectious Diseases*, 13(11), pp. 1-7. DOI: 10.1186 / 1471-2334-13-11

- Hernandez-Milian, A. y Payeras-Cifre A. (2014). “What is new in listeriosis?” *BioMed Research International*, 2014:358051, pp. 1-8. DOI: 10.1155/2014/358051.
- Herrador, Z., Gherasim, A., López-Vélez, R. y Benito, A. (2019). “Listeriosis in Spain based on hospitalisation records, 1997 to 2015: need for greater awareness”. *Eurosurveillance*, 24(21). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2019.24.21.1800271
- Ibarra-Sánchez, L.A., Van Tassell, M.L. y Miller, M.J. (2017). “Invited review: Hispanic-style cheeses and their association with *Listeria monocytogenes*”. *Journal of Dairy Science*, 100(4), pp. 2421-2432. DOI: 10.3168/jds.2016-12116
- INE (Instituto Nacional de Estadística) (2020). *Población por comunidades, edad (grupos quinquenales), Españoles/extranjeros, sexo y año*. Disponible en: <https://www.ine.es/jaxi/Tabla.htm?path=/t20/e245/p08/10/&file=02002.px> [Consultado 03-06-2021].
- IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries) (2014). *Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo*. Disponible en: [https://acsa.gencat.cat/web/.content/\\_Publicacions/Informes-tecnics/Informes\\_ACSA/informe\\_listeria\\_irta\\_2014\\_castella.pdf](https://acsa.gencat.cat/web/.content/_Publicacions/Informes-tecnics/Informes_ACSA/informe_listeria_irta_2014_castella.pdf). [Consultado 30-05-2021].
- Jamali H., Radmehr B. y Thong K.L. (2013). “Prevalence, characterisation, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks”. *Food Control*, 34(1), pp. 121-125. DOI: 10.1016/j.foodcont.2013.04.023
- Kadam, S.R., den Besten, H.M.W., van der Veen, S., Zwietering, M.H., Moezelaar, R. y Abee, T. (2013). “Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin”. *International Journal of Food Microbiology*, 165(3), pp. 259-264. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025
- Kasra-Kermanshahi, R. y Mobarak-Qamsari, E. (2015). “Inhibition effect of lactic acid bacteria against food born pathogen, *Listeria monocytogenes*”. *Applied Food Biotechnology*, 2(4), pp. 11-19. DOI:10.22037/afb.v2i4.8894
- Lamont, R.F., Sobel, J., Mazaki-Tovi, S., Kusanovic, J.P., Vaisbuch, E., Kim, S.K., Uldbjerg, N. y Romero, R. (2011). “Listeriosis in human pregnancy: a systematic review”. *Journal of Perinatal Medicine*, 39(3), pp. 227-236. DOI: 10.1515/jpm.2011.035
- Leclercq A., Oevermann A., Danguy-des-Déserts R., Granier S.A., Hammack T., Jinneman K., Chen Y., Rathbone R. y Riegler G. (2014). “*Listeria monocytogenes*”. En: *Terrestrial Manual*. París: OIE (World Organisation for Animal Health).
- Lecuit, M. (2020). “*Listeria monocytogenes*, a model in infection biology”. *Cellular Microbiology*, 22, pp. 1-8. DOI: 10.1111/cmi.13186

- Leibniz Institute DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Prokaryotic Nomenclature (2021). *Listeria monocytogenes*. Disponible en: <https://lpsn.dsmz.de/species?page=L> [Consultado 30-03-2021].
- Lepe, J.A. (2020). “Current aspects of listeriosis”. *Medicina Clínica*, 154(11), pp. 453-458. DOI: 10.1016/j.medcle.2020.02.002
- Li, F., Ye, Q., Chen, M., Zhou, B., Xiang, X., Wang, C., Shang, Y., Zhang, J., Pang, R., Wang, J., Xue, L., Cai, S., Ding, Y. y Wu, Q. (2021). “Mining of novel target genes through pan-genome analysis for multiplex PCR differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serotypes”. *International Journal of Food Microbiology*, 339. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.109026
- Lobacz, A., Kowalik, J. y Tarczynska, A. (2013). “Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in mold-ripened cheeses”. *Journal of Dairy Science*, 96(6), pp. 3449-3460. DOI: 10.3168/jds.2012-5964
- Lomonaco, S., Nucera, D. y Filipello, V. (2015). “The evolution and epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Europe and the United States”. *Infection, Genetics and Evolution*, 35, pp. 172-183. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.08.008
- MAPA (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) (2021). *Informe del consumo de alimentación en españa 2020*. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/eu/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-anual-consumo-2020\\_baja-res\\_tcm35-562704.pdf](https://www.mapa.gob.es/eu/alimentacion/temas/consumo-tendencias/informe-anual-consumo-2020_baja-res_tcm35-562704.pdf) [Consultado 01-06-2021].
- Martínez-Ríos, V. y Dalgaard, P. (2018). “Prevalence of *Listeria monocytogenes* in European cheeses: A systematic review and meta-analysis”. *Food Control*, 84, pp. 205-214. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.07.020
- Mateus, T., Silva, J., Maia, R.L. y Teixeira, P. (2013). “Listeriosis during pregnancy: a Public Health concern”. *ISRN Obstetrics and Gynecology*, 2013(2):851712, pp. 1-6. DOI: 10.1155/2013/851712
- MICIU (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades) (2019). *Informe epidemiológico de listeriosis. Casos notificados a la RENAVE en los años 2015-2018*. Disponible en: [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/resultados%20vigilancia/Informe\\_listeriosis-RENAVE\\_28082019.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/resultados%20vigilancia/Informe_listeriosis-RENAVE_28082019.pdf) [Consultado 18-03-2021].

- Olaimat, A.N., Al-Holy, M.A., Shahbaz, H.M., Al-Nabulsi, A.A., Abu Ghoush, M.H., Osaili, T.M., Ayyash, M.M. y Holley, R.A. (2018). “Emergence of antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes* isolated from food products: A comprehensive review”. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), pp. 1277-1292. DOI: 10.1111/1541-4337.12387
- Orsi, R.H. y Wiedmann, M. (2016). “Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, pp. 5273-5287. DOI: 10.1007/S00253-016-7552-2
- Ortiz Jareño, M.S. (2016). *Diversidad genética y persistencia ambiental de Listeria Monocytogenes en dos plantas de procesado de carne de cerdo ibérico: influencia de la resistencia a desinfectantes de amonio cuaternario*. Tesis Doctora. Universidad Complutense de Madrid.
- Parrilla Valero, F. (2011). *Estudio de incidencia de la listeriosis en España*. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Possas, A., Bonilla-Luque, O.M. y Valero, A. (2021). “From cheese-making to consumption: exploring the microbial safety of cheeses through predictive microbiology models”. *Foods*, 10(2)355, pp. 1-22. DOI: 10.3390/foods10020355
- Pouillot, R., Hoelzer, K., Chen, Y. y Dennis, S.B. (2015). “*Listeria monocytogenes* dose response revisited-incorporating adjustments for variability in strain virulence and host susceptibility”. *Risk Analysis*, 35(1), pp. 90-108. DOI: 10.1111/risa.12235
- Pouillot, R., Klontz, K.C., Chen, Y., Burall, L.S., Macarisin, D., Doyle, M., Bally, K.M., Strain, E., Datta, A.R., Hammack, T.S. y Van Doren, J.M. (2016). “Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream, United States, 2015”. *Emerging Infectious Diseases*, 22 (12), 2113-2119. DOI: 10.3201/eid2212.160165
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) (2019). “RASFF annual report 2019”. DOI: 10.2875/993888
- RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) (2021) *Portal RASFF/RASFF Window*. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/list> [Consultado 28-04-2021].
- Reis-Teixeira, F.B.D., Farias Alves, V. y Pereira de Martinis, E.C. (2017). “Growth, viability and architecture of *biofilms* of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces”. *Brazilian Journal of microbiology*, 48(3), pp. 587-591. DOI: 10.1016/j.bjm.2017.01.004
- Rodríguez-Auad, J.P. (2018) “Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*”. *Revista Chilena Infectología*, 35(6), pp. 649-657. DOI: 10.4067/S0716-10182018000600649

- Rosshaug, P.S., Detmer, A., Ingmer, H. y Larsen, M.H. (2012). "Modeling the growth of *Listeria monocytogenes* in soft blue-white cheese". *Applied and environmental microbiology*, 78(24), pp. 8508-8514. DOI: 10.1128/AEM.01865-12
- Ruusunen, M., Salonen, M., Pulkkinen, H., Huuskonen, M., Hellstroom, S., Revez, J., Hänninen, M.L., Fredriksson-Ahomaa, M. y Lindström, M. (2013). "Pathogenic bacteria in Finnish bulk tank milk". *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(2), pp. 99-106. DOI: 10.1089/fpd.2012.1284
- Schirone, M., Visciano, P., Tofalo, R. y Suzzi, G. (2017). "Editorial: Biological hazards in food". *Frontiers in microbiology*, 7(2154), pp. 1-3. DOI: 10.3389/fmicb.2016.02154
- Schvartzman, M.S., Maffre, A., Tenenhaus-Aziza, F., Sanaa, M., Butler, F. y Jordan, K. (2011). "Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk". *International Journal of Food Microbiology*, 145(1), pp.31-38. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.032
- Tiwari, U., Cummins, E., Valero, A., Walsh, D., Dalmasso, M., Jordan, K. y Duffy, G. (2015). "Farm to fork Quantitative Risk Assessment of *Listeria monocytogenes* contamination in raw and pasteurized milk cheese in Ireland". *Risk Analysis*, 35(6) pp. 1140-1153. DOI: 10.1111/risa.12332
- Toledo V., Den Bakker H.C., Hormazábal J.C., González-Rocha G., Bello-Toledo H., Toro M., Moreno-Switt A.I. (2018). "Genomic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical and non-clinical samples in Chile". *Genes*, 9(8):396. DOI: 10.3390/genes9080396
- Valero, A., Hernández, M., De Cesare, A., Manfreda, G., González-García, P. y Rodríguez-Lázaro, D. (2014). "Survival kinetics of *Listeria monocytogenes* on raw sheep milk cured cheese under different storage temperatures". *International Journal of Food Microbiology*, 184, pp. 39-44. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.017
- Vera, A., González, G., Domínguez M. y Bello H. (2013). "Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation". *Revista chilena de infectología*, 30(4), pp. 407-416. DOI: 10.4067/S0716-10182013000400010
- Wai, G.Y., Tang, J.Y.H., New, C.Y. y R, S. (2019). "A review on *Listeria monocytogenes* in food: prevalence, pathogenicity, survivability and antibiotic resistance". *Food Research*, 4(1), pp. 20-27 DOI: 10.26656/fr.2017.4(1).155.

### **Referencias legales:**

- Real Decreto 1113/2006, de 29 de septiembre, por el que se aprueban las normas de calidad para quesos y quesos fundidos. *Boletín Oficial del Estado*, 239, de 6 de octubre de 2006.
- Reglamento (CE) nº 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 31, de 1 de febrero de 2002.
- Reglamento (CE) nº 853/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 139, de 30 de abril 2004.
- Reglamento (CE) nº 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (2005). *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, de 22 de diciembre de 2005.
- Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional. *Boletín Oficial del Estado*, 17 de marzo de 2015, núm. 65, pp. 24012-24015.

## ANEXO A

Criterios de seguridad alimentaria para el queso como alimento listo para el consumo  
(Reglamento (CE) n° 2073/2005):

Categoría de Alimentos	Microorganismos / sus toxinas, metabolitos	Plan de toma de muestras <sup>(1)</sup>		Límites <sup>(2)</sup>		Método Analítico de referencia <sup>(3)</sup>	Fase en la que se aplica el criterio
		n	c	m	M		
Alimentos listos para el consumo que pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g <sup>(5)</sup>		EN/ISO 11290-2 <sup>(6)</sup>	Productos comercializados durante su vida útil
		5	0	No detectado en 25 g <sup>(7)</sup>		EN/ISO 11290-1	Antes de que el alimento haya dejado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria que lo ha producido
Alimentos listos para el consumo que no pueden favorecer el desarrollo de <i>L. monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales <sup>(4)</sup> .	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 <sup>(6)</sup>	Productos comercializados durante su vida útil

<sup>(4)</sup> En circunstancias normales, no es útil realizar pruebas regulares sobre este criterio para los siguientes productos alimenticios listos para el consumo: los que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar la *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento.

<sup>(5)</sup> Este criterio se aplica si el fabricante puede demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil. El explotador podrá fijar límites intermedios durante el proceso que deberían ser lo suficientemente bajos para garantizar que no se supere el límite de 100 ufc/g al final de la vida útil.

<sup>(6)</sup> Sobre una placa Petri de 140 mm de diámetro o tres placas Petri de 90 mm de diámetro se siembra 1 ml de inóculo.

<sup>(7)</sup> Este criterio se aplica a los productos antes de que hayan abandonado el control inmediato del explotador de la empresa alimentaria cuando este no pueda demostrar, a satisfacción de la autoridad competente, que el producto no superará el límite de 100 ufc/g durante su vida útil.

## ANEXO B

Está permitido el uso de leche cruda para consumo humano si cumple los requisitos sanitarios contemplados en el apartado I del capítulo I de la sección IX del anexo III del Reglamento (CE) nº 853/2004:

1. Si procede de animales que no presenten síntomas de enfermedades contagiosas transmisibles al hombre por la leche y el calostro, que estén en un buen estado de salud general, no presenten signos de enfermedad que pueda contaminar la leche y el calostro y, en particular, no padezcan infecciones del aparato genital con flujo, enteritis con diarrea acompañada de fiebre ni inflamaciones perceptibles de la ubre. Además, no deben presentar ninguna herida en la ubre que pueda alterar la leche y el calostro, no se les puede haber administrado sustancias o productos no autorizados y, en el caso de administración de productos o sustancias autorizados, que se haya respetado el plazo de espera prescrito para dichos productos o sustancias.

2. En particular, la leche cruda y el calostro deberán proceder de: vacas o búfalas que procedan de un rebaño que haya sido declarado indemne u oficialmente indemne de brucelosis y tuberculosis; ovejas o cabras pertenecientes a una explotación que haya sido declarada indemne u oficialmente indemne de brucelosis, o bien, de hembras de otras especies pertenecientes, en el caso de las especies sensibles a la brucelosis y tuberculosis, a rebaños inspeccionados periódicamente respecto a esta enfermedad según un plan de inspección aprobado por la autoridad competente.

3. Sin embargo, podrán utilizarse, con la autorización de la autoridad competente, leche cruda y calostro procedentes de animales que no cumplan los requisitos del punto 2:

a) en el caso de las vacas y búfalas que no den positivo a las pruebas de la brucelosis o la tuberculosis ni presenten síntomas de estas enfermedades, tras haber sido sometidos a un tratamiento térmico hasta dar negativo a la prueba de la fosfatasa alcalina;

b) en el caso de las ovejas o cabras que no den positivo a las pruebas de la brucelosis, o que hayan sido vacunadas contra la brucelosis en el marco de un programa autorizado de erradicación, y que no presenten síntomas de esta enfermedad: ya sea para la elaboración de queso con un período de maduración de al menos dos meses, o bien, tras haber sido sometidos a un tratamiento térmico hasta dar negativo a la prueba de la fosfatasa alcalina, y



c) en el caso de hembras de otras especies que no den positivo a las pruebas de la tuberculosis ni de la brucelosis ni presenten síntomas de estas enfermedades, pero pertenezcan a un rebaño en el que se hayan detectado estas enfermedades a raíz de las pruebas a que se refiere el punto 2, letra a), inciso iii), o el punto 2, letra b), inciso ii), si han sido sometidos a un tratamiento que garantice su inocuidad.

### ANEXO C

Categorías de quesos en función del riesgo relativo de contraer listeriosis por el consumo de una ración (IRTA, 2014):

<b>Categoría del riesgo</b>	<b>Tipo de queso</b>
<b>Riesgo muy alto a riesgo alto</b>	Queso elaborado con leche cruda y con < 60 días de maduración
<b>Riesgo alto a riesgo moderado</b>	Queso fresco no madurado (> 50% humedad: requesón, <i>ricotta</i> , etc.)
<b>Riesgo moderado a riesgo bajo</b>	- Queso fresco cremoso - Queso blando madurado (> 50% humedad: brie, camembert, feta, etc.) - Queso semiblando (39% - 50% humedad: queso azul, etc.)
<b>Riesgo bajo a riesgo muy bajo</b>	- Queso procesado (queso fundido, para untar, etc.) - Queso duro y curado (< 39% humedad: parmesano, <i>cheddar</i> )