



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**PRIMERA EXPLORACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* EN
REFRIGERADORES DOMÉSTICOS DE LA CIUDAD DE MONTEVIDEO**

por

**VIDAL PÉREZ, Ana Cristina
TUR MÁRQUEZ, Bruno Nicolás**

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

Modalidad: Estudio de caso

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2020**

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



Dr. José Pedro Dragonetti

Segundo miembro (Tutor):



Dr. Gonzalo Crosi

Tercer miembro:



Dra. Silvana Carro

Cuarto miembro (Co-tutor):



Dra. Cristina Friss de Kereki

Fecha:

22 de Abril 2020

Autores:



Br. Ana Vidal Pérez



Br. Bruno Tur Marquez

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, queremos agradecer a nuestro tutor, el Dr. Gonzalo Crosi y a nuestra co-tutora, la Dra. Cristina Friss de Kereki, por su constante ayuda, tiempo brindado y enseñanzas durante el transcurso de esta investigación.

A Gonzalo Chalela, preparador del laboratorio de IIP, por su apoyo y tiempo dedicado durante el procesamiento de las muestras.

A todo el equipo docente del departamento de pesca, ya que de un modo u otro nos brindaron su colaboración.

Al personal de la biblioteca por brindarnos material bibliográfico.

A todos quienes nos abrieron las puertas de sus hogares para poder extraer muestras de sus refrigeradores.

A nuestras familias y amigos por su invaluable apoyo y compañía durante el transcurso, no sólo de este trabajo, sino de toda la carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

Página

1. RESUMEN.....	6
2. SUMMARY.....	7
3. INTRODUCCIÓN.....	8
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	10
4.1 Características del género <i>Listeria</i>	10
4.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	11
4.2.1 Parámetros de crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	11
4.3 Patogenia de la listeriosis	13
4.4 Aspectos clínicos.....	13
4.5 Fuentes de exposición alimentaria.....	14
4.6 Biofilm o Biopelículas.....	17
4.7 <i>Listeria monocytogenes</i> en refrigeradores domésticos.....	19
4.8 Detección de <i>Listeria spp</i> y <i>Listeria monocytogenes</i>	20
5. HIPÓTESIS.....	24
6. OBJETIVOS.....	24
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
a. Procedimiento de muestreo.....	25
b. Encuesta.....	25
c. Aislamiento e identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en laboratorio.....	25
d. Análisis estadístico.....	27
8. RESULTADOS.....	27
9. DISCUSIÓN.....	33
10. CONCLUSIONES.....	36
11. BIBLIOGRAFÍA.....	37
12. ANEXOS.....	43

ÍNDICES DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

	Página
Tabla 1. Factores que inciden en el crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i>	12
Tabla 2. Distribución de casos de Listeriosis según año, sexo, lugar de residencia, edad y evolución. Uruguay periodo 2010 - 2018	17
Tabla 3. Diferenciación de especies de Listeria en base a distintas pruebas.....	22
Tabla 4. Resumen de aislamientos por especie.....	28
Tabla 5. Relación entre <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> y ambos microorganismos con la temperatura del refrigerador.....	31
Tabla 6. Relación entre <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> y ambos microorganismos con la frecuencia de limpieza y/o desinfección del refrigerador.....	32
Tabla 7. Relación entre <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> y ambos microorganismos con el tipo de producto de higiene aplicado al refrigerador.....	32
Tabla 8. Relación entre <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> y ambos microorganismos con la protección de los alimentos dentro del refrigerador.....	33

FIGURAS

	Página
Figura 1. Número de brotes de ETA reportados en Uruguay, 1993 – 2016.....	9
Figura 2. Flujograma general de los métodos de detección de <i>L. monocytogenes</i> ..	20
Figura 3. Método horizontal para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> según norma ISO 11290-1:2017.....	21
Figura 4. Representación esquemática para el aislamiento e identificación de <i>Listeria</i>	26
Figura 5. Muestra positiva de <i>Listeria spp</i> en CHROMagar™ Listeria.....	47
Figura 6. Muestra positiva de <i>L. innocua</i> en CHROMagar™ Listeria.....	47
Figura 7. Muestra positiva de <i>L. monocytogenes</i> en CHROMagar™ Listeria.....	48
Figura 8. Muestra positiva de <i>Listeria spp</i> en CHROMagar™ Identification Listeria.....	48
Figura 9. Muestra positiva de <i>L. innocua</i> en CHROMagar™ Identification Listeria.....	49
Figura 10. Muestra positiva de <i>Listeria monocytogenes</i> en CHROMagar™ Identification Listeria.....	49

1. RESUMEN

Listeria monocytogenes es uno de los microorganismos patógenos reemergentes más relevantes de los últimos años, es responsable de casos individuales y brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA); con serias consecuencias en la salud pública. Es una bacteria muy extendida en el medio ambiente, con portadores en varias especies como ser: bovinos, ovinos, suinos, aves, equinos y humanos, y su principal vía de transmisión son los alimentos, destacándose dentro de éstos, los alimentos listos para el consumo. Una de las características más importantes de *L. monocytogenes*, es su capacidad para sobrevivir y multiplicarse a temperaturas de refrigeración, característica que inspira el presente estudio. Por otra parte, *Listeria innocua* es otra especie dentro del género *Listeria*, si bien no es patógena, comparte características de crecimiento con *L. monocytogenes*, por lo cual es factible el crecimiento del patógeno si se encuentra presente *L. innocua*. El presente trabajo tuvo como objetivo principal determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en refrigeradores domésticos en la ciudad de Montevideo y simultáneamente se evaluó los posibles factores que influyen en el crecimiento, tales como temperatura, condiciones higiénicas de los refrigeradores y buenas prácticas de almacenamiento. Se encontró que *L. monocytogenes* estaba presente en 4 de los 100 refrigeradores muestreados y *Listeria innocua* en 22 de los 100 refrigeradores investigados. El 86% de los refrigeradores muestreados funcionaba a una temperatura superior a 4.0°C, siendo este un factor de gran importancia ya que dicho microorganismo se desarrolla fácilmente a estas temperaturas. Se determinó que el 100% de los refrigeradores muestreados eran higienizados de forma incorrecta, utilizando detergente o desinfectante, o ambos productos mezclados. La frecuencia de limpieza y/o desinfección resultó ser en el 49% de los casos mayor a un mes. Se observó que en el 42% de los refrigeradores se almacenaba alimentos crudos junto a alimentos listos para consumir, y el 39% almacenaba alimentos sin ningún tipo de protección, siendo este un factor muy importante para la contaminación tanto de alimentos como del propio refrigerador.

2. SUMMARY

Listeria monocytogenes is one of the most relevant reemerging pathogenic microorganisms in recent years, is responsible for individual cases and outbreaks of foodborne diseases (ETA); with serious consequences on public health. It is a widespread bacterium in the environment, with carriers in several species such as: cattle, sheep, suines, birds, horses and humans, and its main route of transmission is food, standing out within them, ready-to-eat foods. consumption. One of the most important characteristics of *L. monocytogenes*, is its ability to survive and multiply at cooling temperatures, characteristic that inspires the present study. On the other hand, *Listeria innocua* is another species within the genus *Listeria*, although it is not pathogenic, it shares growth characteristics with *L. monocytogenes*, so the growth of the pathogen is feasible if *L. innocua* is present. The main objective of this work was to determine the presence of *Listeria monocytogenes* in domestic refrigerators in the city of Montevideo and simultaneously the possible factors that influence growth were evaluated, such as temperature, hygienic conditions of the refrigerators and good storage practices. *L. monocytogenes* was found to be present in 4 of the 100 refrigerators sampled and *Listeria innocua* in 22 of the 100 refrigerators investigated. 86% of the sampled refrigerators operated at a temperature above 4.0 ° C, this being a factor of great importance since this microorganism develops easily at these temperatures. It was determined that 100% of the sampled refrigerators were sanitized improperly, using detergent or disinfectant, or both mixed products. The frequency of cleaning and / or disinfection was found in 49% of cases greater than one month. It was observed that in 42% of the refrigerators raw food was stored next to ready-to-eat foods, and 39% stored food without any protection, this being a very important factor for the contamination of both food and the refrigerator itself.

3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son un problema sanitario que debe ser considerado en un ámbito de carácter social, tecnológico, económico, cultural y político. Por ser un problema recurrente en los países en vías de desarrollo, las autoridades sanitarias deben dirigir campañas de vigilancia y asistencia continua a fin de prevenir o corregir situaciones que son peligrosas y que afectan la salud de la población (Kopper *et al.*, 2009).

Las ETA se definen como cualquier síndrome originado por la ingestión de productos alimenticios y/o agua que contengan agentes patógenos en cantidades tales, que afecten la salud del consumidor (OMS, 2019).

De acuerdo a la Organización Panamericana de la Salud (PAHO), se pueden presentar de tres diferentes maneras: infecciones causadas por alimentos (ingestión de alimentos que poseen microorganismos patógenos vivos), intoxicaciones causadas por alimentos (toxinas o mohos presentes en el alimento ingerido) y toxiinfecciones alimentarias, producida por el consumo de alimentos que poseen microorganismos (m.o) patógenos vivos y que, al llegar a un lugar propicio en el organismo, se multiplican y liberan toxinas (PAHO, 2015).

Se estima que cada año enferman en el mundo 600 millones de personas (casi uno de cada diez habitantes) por ingerir alimentos contaminados, y que dichas enfermedades, generalmente diarreicas, provocan 2,2 millones de muertes, en su mayoría niños. La diarrea es el síntoma agudo más frecuente de las enfermedades de transmisión alimentaria (OMS, 2019).

El Departamento de Agricultura, Bioseguridad, Nutrición y Protección al Consumidor (AG) de la FAO, a través de las unidades técnicas correspondientes, es responsable del estudio constante de las ETA, para poder asistir a los distintos países en sus esfuerzos por vigilar y controlar estas enfermedades (Kopper *et al.*, 2009).

En los últimos años ha incrementado el número de brotes de ETA, el CDC reporta para el año 2007 un total de 1098 brotes en EEUU, con *Salmonella* como principal agente causal. En el año 2017 esta cifra llega a 4060 brotes reportados en dicho país (CDC, 2017). Algo similar sucede en Uruguay, en el año 2006 se reportan 22 brotes de ETA, y en el año 2016 el reporte alcanza 47 brotes (Figura 1) (MSP, 2017). El constante aumento de brotes, que se ha registrado a nivel mundial se debe a diversos factores, entre ellos, el incremento del turismo, las migraciones poblacionales, caída de las fronteras, la creciente globalización, aumento de la población y acelerada urbanización, aumento del comercio internacional de alimentos, alimentación fuera del hogar: merenderos, hospitales, escuelas, cantinas de empresas, restaurantes, entre otros. Por otra parte, se conoce mejor el comportamiento de los patógenos, por ejemplo, se sabe que éstos están presentes también, en animales sanos, que actúan como reservorio, con la consecuente diseminación de los mismos en el ambiente y el aumento del riesgo de contaminación de los alimentos.

Esto lleva a implementar mayores medidas de seguridad, como los son la vigilancia y el desarrollo de nuevas formas de investigación y detección de estos patógenos por parte de los laboratorios (Acuña *et al.*, 2002).

Figura 1. Número de brotes de ETA reportados en Uruguay, 1993 – 2016



Fuente: División Epidemiología MSP, 2017

Listeria monocytogenes es uno de los patógenos de interés para la salud pública, causante de una enfermedad llamada listeriosis. La mayoría de los patógenos transmitidos por los alimentos que afectan a las poblaciones humanas tienen una morbilidad relativamente alta pero una baja tasa de mortalidad, no obstante *L. monocytogenes* presenta una alta mortalidad, es por esto que ante el diagnóstico de un caso de listeriosis ya se lo considera como un brote de la enfermedad (Schlech & Acheson, 2000). Además de la gastroenteritis febril, la listeriosis es una infección del torrente sanguíneo y del sistema nervioso central (SNC) que puede ser mortal, principalmente en poblaciones de riesgo, existen tres grupos principales, las embarazadas, fetos y niños pequeños, los ancianos, y los individuos con cuadros de inmunosupresión (tumores malignos, administración de corticoides, infección por VIH en etapa SIDA), sobre quienes puede alcanzar valores de letalidad de 30% (Evans, 2016).

Se han destacado los alimentos listos para consumir (LPC) como de alto riesgo en cuanto a la presencia de esta bacteria, es importante destacar que si bien las altas temperaturas la pueden eliminar (70°C por 15 segundos), dichos alimentos no tendrán un tratamiento térmico previo a ser consumidos (Muñoz *et al.*, 2011). Así mismo, los alimentos almacenados a temperaturas de refrigeración durante un período prolongado son considerados de alto riesgo, dado que *Listeria* puede desarrollarse a temperaturas de refrigeración, si bien se trata de una bacteria mesófila, ya que su rango óptimo de crecimiento está entre los 30°C y 37°C, también se la considera psicrotrofa debido a su facilidad para sobrevivir y multiplicarse a bajas temperaturas (-2°C a 4.0°C) (Farber & Peterkin, 1991, FDA, 2012; FAO, 2014).

En nuestro país se han asociado algunos alimentos con la presencia de *L. monocytogenes* de los cuales podemos destacar: embutidos o productos de fiambrería, pescados y carnes crudas o parcialmente cocidas (vacuna, cerdo, aves, etc.), patés, productos de carne para untar o pescados ahumados que requieren refrigeración, leche cruda (sin pasteurizar) y productos elaborados con ella: quesos crudos artesanales, quesos blandos y semiblandos, ensaladas preparadas, frutos del mar ahumados y refrigerados, verduras sin lavar, incluyendo aquellas que se encuentren envasadas (Intendencia de Montevideo, 2014).

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Características del género *Listeria*

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos Gram-positivos cortos, regulares, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. Presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 25°C, sin embargo, se pierde dicha movilidad a 37°C por inactivación de los flagelos. Las colonias son pequeñas (de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación) y lisas. Son bacterias aerobias-anaerobias facultativas, catalasa positivas y oxidasa negativas (ICMSF, 1998).

Listeria spp está presente en una gran variedad de fuentes, tales como agua dulce, salada, polvo ambiental, fertilizantes, vegetación en descomposición; alimentos para animales, alimentos crudos de origen animal, incluidos aves frescas y congeladas, carnes rojas y productos cárnicos; pescado, productos lácteos como leche, quesos y helados; frutas y vegetales crudos; y también a partos de heces de humanos y animales, tanto sanos como sintomáticos (Benadof, 2008).

Dicho género comprende las siguientes especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. dentrificans*. Dentro de éstas, las especies consideradas patógenas son la *L. monocytogenes* que afecta al hombre y *L. ivanovii* asociada a enfermedades en rumiantes (Alcayaga & Hott, 2008; ACHIPIA, 2017). *L. monocytogenes* es la más frecuentemente aislada en laboratorios clínicos y es la causante de la listeriosis (Acuña *et al.*, 2002). Si bien, *L. innocua* no causa enfermedad, comparte características bioquímicas y de cultivo con *L. monocytogenes*, por lo cual se la considera un indicador biológico del patógeno, por otra parte, comparten factores extrínsecos de crecimiento (tales como, temperatura, pH, aW) (Fairchild & Foegeding, 1993).

La identificación de la especie es de suma importancia ya que todos sus miembros pueden llegar a contaminar el alimento, pero solamente *L. monocytogenes* produce patologías en humanos. Dicha identificación se realiza mediante unas pocas reacciones bioquímicas y la capacidad de producir hemólisis, característica esencial para distinguirla de *L. innocua* que es la especie no patógena aislada más a menudo (Dalton *et al.*, 1997).

4.2 *Listeria monocytogenes*

Se trata un bacilo Gram - positivo, aerobio - anaerobio facultativo, no esporulado, con la capacidad de desarrollarse en un amplio rango de temperaturas (FDA, 2012; MSP, 2017).

Listeria monocytogenes se describió por primera vez en Inglaterra por Murray *et al.*, (1926), quienes la caracterizaron como una bacteria Gram positiva con el nombre *Bacterium monocytogenes* (Barón, 2018). Años más tarde, en 1957, el alemán Heinz Seeliger impuso el nombre *Listeria monocytogenes* en honor al reconocido cirujano británico Joseph Lister (Noriega *et al.*, 2008).

Existen trece serovares de *L. monocytogenes* (1/2a, b, c; 3a, b, c; 4a, ab, b, c, d, e, 7), de los cuales, el 4b, 1/2a, y 1/2b se vinculan con mayor frecuencia a cuadros patogénicos (Bell & Kyriakides, 2005).

Se ha estimado una letalidad entre el 15-30%, la cual es muy alta, afectando más gravemente a los grupos de riesgo antes mencionados (FDA, 2012; MSP, 2017). Es una de las causas más frecuente de muertes en humanos por enfermedades transmitidas por alimentos, lo que genera el interés mundial para el control de esta bacteria. En países desarrollados como EEUU y países europeos, se encuentra identificada dentro de las primeras causas de muerte por infecciones alimentarias (Paciel & Medina, 2016).

4.2.1 Parámetros de crecimiento de *L. monocytogenes*

pH y salinidad

Crece en un rango de pH de 4.4 a 9.6, siendo el pH óptimo 7 (Rocourt & Buchrieser, 2007). De varios ácidos (acético, láctico, cítrico y clorhídrico) utilizados para reducir el pH del caldo de infusión de cerebro y corazón antes de usarlo como medio de crecimiento para *L. monocytogenes*, el ácido acético fue el inhibidor de crecimiento más efectivo. Es capaz de crecer en concentraciones de sal de 10% como lo son las salmueras (Farber & Peterkin, 1991) y de sobrevivir a niveles elevados (30%) de NaCl (Doyle, 2001).

Temperatura

Se clasifica dentro de las bacterias mesófilas, con una temperatura máxima de crecimiento de 45°C, ligeramente más resistente al calor que otras bacterias patógenas no esporuladas como la *Salmonella* y *Escherichia coli*. Su temperatura óptima de crecimiento se sitúa entre los 30°C y 37°C. Por otra parte, puede crecer en alimentos a temperaturas de refrigeración, incluso por debajo de 0°C (-2.0°C), por la que también suele clasificarse como una bacteria psicrótrofa (ICMSF, 1998). Jay *et al.* (2005), indican que los psicrótrofos sintetizan lípidos neutros y fosfolípidos que contienen una proporción más elevada de ácidos grasos insaturados cuando crecen

a bajas temperaturas en comparación con temperaturas más elevadas. Este aumento en el grado de insaturación de los ácidos grasos, implica un descenso en el punto de fusión de los mismos y tiene la función de mantener los lípidos en estado líquido con mayor movilidad, con lo que permite a la actividad de la membrana continuar su habitual cometido. El organismo resiste bien durante varias semanas a -18°C en varios sustratos alimenticios y es posible que el almacenamiento en congelación durante un mes destruya muy pocas listerias (ICMSF, 1998). En lo que a su inactivación refiere, es destruida por los procesos térmicos usados de rutina en la industria alimentaria, como lo son la pasteurización (75°C durante 15 segundos) y esterilización (120°C durante 4 minutos) (De Matteis, 2018).

Efecto combinado de pH, NaCl y temperatura

Varios estudios han sido realizados sobre la interacción del NaCl con el pH y la temperatura, y se ha llegado a la conclusión de que los efectos del NaCl y el pH son aditivos y no presentan ningún tipo de sinergismo (James, 2009). Extrañamente, bajas concentraciones de sal (4-6%) parecen brindarle una escasa protección contra pH ácidos. La temperatura es un factor influyente en la supervivencia de *L. monocytogenes* cuando es sometida a estrés ácido y osmótico. A bajas temperaturas (5°C - 10°C), la bacteria pudo sobrevivir durante más tiempo a altas concentraciones de sal y bajo pH que cuando se la sometió a temperaturas mayores (30°C) bajo las mismas condiciones (Cole *et al.*, 1990).

Atmósfera de envasado

Es capaz de sobrevivir y crecer bajo condiciones de anaerobiosis, lo que la hace un peligro potencial para alimentos envasados al vacío o en atmósferas modificadas, alimentos que comúnmente se almacenan en refrigeración (Shineman & Harrison, 1994).

Aw

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

Tabla 1. Factores que inciden en el crecimiento de *Listeria monocytogenes*

Condiciones de crecimiento	Mínimo	Máximo	Óptimo
Temperatura (°C)	- 2 a 4	45	30 a 37
pH (HCl como acidulante)	4.2 a 4.3	9.4 a 9.5	7.0
aw (NaCl como humectante)	0.90 a 0.93	> 0.99	0.97
Concentración de sal (% NaCl en fase acuosa)	< 0.5	12 a 16	-

Adaptado de: Bover & Garriga, 2014

4.3 Patogenia de la listeriosis

Listeria monocytogenes puede invadir el organismo humano de diversas maneras, a través del ojo y la piel después de una exposición directa (en accidentes de laboratorio, por ejemplo); aunque se cree que el tracto gastrointestinal es la vía de acceso más importante (Rossi *et al.*, 2008).

Se trata de una bacteria intracelular facultativa, puede sobrevivir en macrófagos e invadir otras células tales como las células epiteliales, hepatocitos y células endoteliales. Debido a esta característica es que los anticuerpos humorales no logran brindar una protección efectiva. Se unen a las células a través de una proteína (integrina), para luego ser fagocitadas por células del huésped. Una vez dentro de las células fagocíticas son sometidas a un pH y ferritina bajos para tratar de eliminarla, pero esto produce que la bacteria active una exotoxina (listeriolisina O), la cual es capaz de lisar la membrana del fagolisosoma y así acceder al citoplasma celular. La listeriolisina O es una exotoxina hemolítica y citolítica, por lo que se entiende que es un importante factor de virulencia de la bacteria. *L. monocytogenes* se disemina célula a célula sin entrar en contacto con el medio extracelular, por lo cual es necesario que la inmunidad que se ponga en juego sea la mediada por células. Luego de atravesar la barrera gastrointestinal, llegan al hígado, donde se multiplican activamente (Acuña *et al.*, 2002). Más del 90% de bacterias son acumuladas en el hígado, capturadas por las células de Kupffer. En experimentos de depleción del sistema inmune "*in vivo*", los macrófagos residentes destruyen la mayoría de bacterias ingeridas, lo que resulta en la disminución del tamaño de la población bacteriana, durante las primeras 6 horas de infección (Ebe *et al.*, 1999). Las células de Kupffer inician el desarrollo de la inmunidad anti-*Listeria* induciendo la proliferación dependiente de antígenos de linfocitos T y la secreción de citoquinas (Gregory & Wing, 1990).

Si la replicación no es contenida por la inmunidad innata del hospedero, la bacteria es capaz de escapar y continuar replicándose. Por lo tanto, la supervivencia del hospedero es dependiente de una efectiva respuesta inmune adaptativa, la cual, en caso de fallar, le permitirá a la bacteria reingresar al torrente sanguíneo y alcanzar el

cerebro (meningitis/meningoencefalitis) o la placenta (placentitis), causando una infección sistémica potencialmente fatal (Camejo *et al.*, 2011).

4.4 Aspectos clínicos

La listeriosis se define clínicamente cuando el microorganismo es aislado de sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR) o de otros sitios del organismo humano o animal que normalmente son estériles, como la placenta (Low & Donachie, 1997).

En cuanto a la población con mayor riesgo, existen 3 grupos principales, las embarazadas y sus fetos, los ancianos, y los individuos con cuadros de inmunosupresión (tumores malignos, administración de corticoides, infección por VIH en etapa SIDA, entre otros) (Torres *et al.*, 2005).

Esta enfermedad se puede presentar como una gastroenteritis febril leve, en personas sanas, o puede presentarse la forma invasiva llevando a una meningitis, meningoencefalitis o bacteriemia en grupos de riesgo (Tejera *et al.*, 2015).

El período de incubación varía entre 1 y 90 días, siendo ésta una característica que dificulta el diagnóstico y la identificación del alimento implicado como fuente de infección en casos o brotes de listeriosis (FDA, 2012; Suárez *et al.*, 2017).

Existen dos formas de presentación de la enfermedad:

- a. Listeriosis no invasiva (gastroenteritis febril por *Listeria monocytogenes*), es una forma leve que afecta sobre todo a personas sanas. Los síntomas son diarrea, fiebre, dolores musculares y de cabeza. Los brotes de esta enfermedad se relacionan generalmente con la ingesta de alimentos que contienen entre 10^5 y 10^6 UFC/g de alimento (Suárez *et al.*, 2017).
- b. Listeriosis invasiva (con varios cuadros adyacentes), puede darse durante el embarazo, principalmente en el último tercio, donde las pacientes suelen presentar fiebre, escalofrío, dolor dorsal, con posibilidades de provocar la muerte fetal o un parto prematuro de un feto infectado. También se asocia esta bacteria con la granulomatosis infantiséptica, cuando se da la transmisión transplacentaria. En estos casos el recién nacido presenta granulomas en múltiples órganos (hígado, bazo, pulmones, riñones y encéfalo), con una letalidad que puede alcanzar el 100%. También puede provocar meningoencefalitis en período neonatal tardío y en adultos con comorbilidad. Se la ha visto involucrada en encefalitis, en pacientes que presentan cefalea y fiebre o parálisis que simulan un ataque cerebrovascular. Puede generar, además, infecciones focales a nivel cutáneo, ésta se ha visto en veterinarios en contacto con animales enfermos y en trabajadores de laboratorio, ambos con exposición directa al patógeno. Para esta forma de presentación de la enfermedad se requiere una dosis infectante de 100 UFC /g de alimento (Torres *et al.*, 2005).

Se ha visto que *Listeria monocytogenes* puede ser refractaria a los mecanismos bactericidas de muchos antibióticos porque es intracelular y usa este mecanismo para

multiplicarse y protegerse de los antibióticos que se encuentran en el fluido extracelular. Sólo pocos agentes antimicrobianos pueden penetrar, acumularse y alcanzar el citosol de las células que hospedan este microorganismo (Charpentier & Courvalin, 1997). Los más utilizados son tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, vancomicina y cefalotina (Oteo & Alós, 1997).

4.5 Fuentes de exposición alimentaria

El hábitat primario de la *L. monocytogenes* es el suelo y los vegetales en descomposición, en los cuales se desarrolla en forma saprófita. Como ya hemos mencionado, dicho microorganismo tiene una amplia distribución por lo que existe un riesgo alto de contaminación de los alimentos durante su producción o procesamiento. Ha sido aislada en ganado vacuno, ovejas, cabras, aves de corral, y con menos frecuencia en animales salvajes (Farber & Peterkin, 1991).

“A pesar de su ubicuidad la incidencia anual de listeriosis es baja en nuestro país, 0.7 enfermos cada 100.000 habitantes, aunque la tasa anual de infección es 3 veces más alta en mayores de 70 años y 17 veces más alta en embarazadas” (Acuña *et al.*, 2002).

Los alimentos contaminados con esta bacteria son considerados el principal vehículo para la listeriosis. Se estima que el 99% de las listeriosis son transmitidas por los alimentos (Scallan *et al.*, 2011).

En la mayoría de los brotes de esta enfermedad los alimentos involucrados contaban con valores superiores a 10^3 CFU/g de la bacteria (FDA/FSIS, 2001). No obstante, la respuesta de la población es muy variable y depende del triángulo, hospedador, patógeno y alimento (Allos *et al.*, 2004).

Es amplia la variedad de alimentos que han servido como fuente de exposición al patógeno en brotes de la enfermedad. La Unión Europea (UE) ha registrado un aumento en las notificaciones de casos y brotes, identificando como alimentos implicados los crustáceos, mariscos, moluscos y subproductos; queso; carne y productos cárnicos, carne de cerdo y subproductos, verduras, jugos y productos derivados (ensalada mixta). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) informó que, en 2013, se notificaron 1763 casos confirmados de listeriosis en humanos en 27 estados miembros, con una tasa de notificación de 0,44 casos por cada 100.000 habitantes (8,6% más que en 2012). En promedio, el 99,1% de los casos fueron hospitalizados. La tasa de letalidad en ese año (2013) fue de 15,6% (AECOSAN, 2019).

Por su parte, Estados Unidos (EEUU) ha experimentado en el 2010 una serie de brotes de listeriosis atribuidos a alimentos considerados de "riesgo moderado" o de bajo riesgo, incluidas frutas y verduras (por ejemplo, apio, lechuga, melón, brotes, fruta de hueso y manzanas acarameladas), así como helados (Buchanan *et al.*, 2017).

Más recientemente, en el año 2017, se destaca el brote multiestado de listeriosis asociado al consumo de queso elaborado con leche sin pasteurizar. Este evento afectó a un total de 8 personas, todos hospitalizados, de los cuales 2 fallecieron (CDC, 2017).

En Uruguay, el primer caso registrado de listeriosis (neurolisteriosis) fue en 1968 por Galiana *et al.* (Acuña *et al.*, 2002). En 2018 se aislaron e identificaron 35 cepas de *Listeria*: 29 *L. innocua* y 6 *L. monocytogenes*, en medias reses de dos frigoríficos de nuestro país, los aislamientos fueron llevado a cabo por el Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU, 2018).

Desde el año 1995, el país cuenta con un sistema de Vigilancia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (sistema VETA), lo que ha permitido tener información sobre el comportamiento de este tipo de enfermedades. La notificación por sospecha de cualquier enfermedad transmitida por alimentos es obligatoria dentro de las 24 horas (Decreto 41/012). Dicha vigilancia es llevada a cabo mediante una estrategia universal en base a la identificación de los casos clínicos y su posterior confirmación a través de análisis de laboratorio (MSP, 2017).

En Uruguay, la vigilancia de las infecciones invasivas por *Listeria monocytogenes* se realiza por medio de la notificación obligatoria de meningitis. El Departamento de Laboratorios de Salud Pública recibe las cepas aisladas ya sea en muestras de líquido cefalorraquídeo en el caso de meningitis o de hemocultivos en otras formas de presentación invasiva. Por la importancia del patógeno, la sospecha de un sólo caso de *Listeria monocytogenes* se debe notificar de inmediato, procediendo obligatoriamente a la búsqueda urgente de más casos (MSP, 2017).

En particular, la vigilancia de listeriosis invasiva, en la cual se denuncian los casos de meningitis, permitió tener registros de esta enfermedad en Uruguay. Entre los años 2010 y 2013 se constataron 11 casos que cursaron con meningitis y sepsis grave. En todos los casos los pacientes presentaban algún factor predisponente tales como la edad (mayores de 70 años), o alguna enfermedad de base (pacientes diabéticos y alcohólicos) (Tejera *et al.*, 2015).

En el año 2016 se registró un aumento en la incidencia anual de esta enfermedad. Se notificaron 17 casos durante el transcurso del año, con 7 fallecimientos, determinando una letalidad del 41%. En ninguno de los casos se logró identificar el alimento que actuó como fuente de infección (MSP, 2019).

Más en la actualidad, Suárez *et al.* (2017), en un estudio de caso clínico en Uruguay de una niña de 9 años con sintomatología de gastroenteritis febril con afectación neurológica se confirmó meningoencefalitis y se aisló *L. monocytogenes*. En este caso tampoco fue posible identificar un alimento implicado como vehículo.

Estos eventos podrían indicar un cambio en el comportamiento de la enfermedad en Uruguay, con un aumento demostrado en la incidencia de la enfermedad (Tabla 2). El

cambio de cultura y hábitos de alimentación de nuestra población, como por ejemplo el aumento de la demanda de alimentos preparados listos para consumo, pueden ser factores predisponentes que han determinado un aumento en la exposición y riesgo de infección por *L. monocytogenes* (Alcayaga & Hott, 2008).

La listeriosis al igual que otras ETA, son importantes enfermedades para nuestro país, por ser un significativo mercado productor y exportador de alimentos (Acuña *et al.*, 2002).

Tabla 2. Distribución de casos de listeriosis según año, sexo, lugar de residencia, edad y evolución. Uruguay periodo 2010 – 2018

Año	Nº casos	Femenino	Masculino	Departamento	Edad	Evolución
2010	1	1	0	1 Durazno	74 años	s/d
2011	5	1	4	Maldonado 1	11m	s/d
				Montevideo 3	71 a, 83,a, 41a	
				San José 1	35 a	
2012	6	5	1	Canelones 2	65 a, 73 a	s/d
				Montevideo 3	45 a, 22 a,21 a	
				Salto 1	60 a	
2013	3	0	3	Montevideo 3	84 a, 54 a, 66 a	s/d
2014	12	6	6	Florida 2	75 a, 50 a	s/d
				Montevideo 6	3 d, 5 d, 26 a, 45 a, 50 a, 57 a	
				Rocha 1	50 a	
				Tacuarembó 1	1d	
				Treinta y Tres 1	4 a	
				Colonia 1	sd	
2015	6	3	3	Montevideo 4	48 a, 57 a, 70 a, 83 a	Fallecidos 2 70 a, 48 a
				Rivera 1	51 a	
				Canelones 1	75 a	
2016	17	9	8	Canelones 3	3 d, 47 a, 62 a	Fallecidos 7 59 a, 40 a, 9 a, 66 a, 63 a, 77 a, 48 a
				Colonia 3	14d , 68 a, 68 a	
				Montevideo 8	68 a, 77 a, 63 a, 59 a, 59 a, 34 a, 48 a, 36 a	
				Soriano 2	22 a, 9 a	
				Treinta y Tres 1	66 a	
2017	8	2	6	Canelones 2	32 a , 22 a	Fallecidos 1
				Maldonado 1	68 a	

				Montevideo 5	3m, 45 a, 83 a, 79 a, 58 a	83 a
2018	9	4	5	Canelones 3	75 a, 46 a, s/d	Fallecidos 1 25 a
				Maldonado 1	s/d	
				Montevideo 5	1 a, 40 a, 64 a, 18 a, 74 a	

Fuente: División de Epidemiología, MSP, 2019

4.6 Biofilms o Biopelículas

“Los biofilms se definen como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie viva o inerte, y que pueden presentar una única especie microbiana o un abanico de especies diferentes” (Kraigsley et al., 2002).

Su formación les confiere algunas ventajas a los microorganismos allí presentes, como, por ejemplo, los protege frente a la acción de agentes adversos como lo pueden ser detergentes y desinfectantes. Aumentan la disponibilidad de nutrientes para un mayor crecimiento, posibilita el aprovechamiento del agua, disminuyendo así la posibilidad de deshidratación y favorece el intercambio de material genético (Colesteron et al., 1999).

En lo que respecta a su contenido puede llegar a ser de un 97% de agua. Además, podemos encontrar células bacterianas, la matriz del biofilm es un conglomerado formado principalmente por exopolisacáridos (Sutherland, 2001).

Su conformación es un proceso dinámico que consta de adhesión, colonización y crecimiento de los microorganismos (Kumar & Anand, 1998).

Para la formación de estas biopelículas existen varias fases: “(i) una adsorción reversible de la bacteria planctónica a la superficie, (ii) unión irreversible mediante la producción de la matriz polimérica, (iii) una fase inicial de maduración con crecimiento y división del microorganismo, (iv) una etapa posterior de producción del exopolímero y (v) el desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras” (James, 2009).

Pueden interferir en diferentes procesos y ser causantes de averías en equipos (Kumar & Anand, 1998). En sistemas de agua potable puede llegar a obstruir cañerías atenuando su velocidad y su capacidad de transporte, derivando en un aumento del consumo energético. También es común encontrarlos en intercambiadores de calor y torres de refrigeración afectando la eficacia del proceso. En superficies metálicas puede causar corrosión por la acción de ácidos formados por las bacterias (Chmielewsky & Frank, 2003).

La presencia de *L. monocytogenes* en el entorno de procesamiento de alimentos es la principal fuente de contaminación para los mismos (Fuster, 2006; Ferreira *et al.*, 2014). Se ha descubierto que las cepas de *Listeria monocytogenes* persisten durante años o décadas en las plantas de procesamiento de alimentos (Golovlev, 2002; Ferreira *et al.*, 2014). Dicha persistencia puede deberse a la supervivencia y el crecimiento de ciertas cepas en nichos dentro del entorno alimentario (por ejemplo, grietas y hendiduras de superficies, sellos y juntas que pueden ser difíciles de limpiar y desinfectar), o la reintroducción repetida de tales cepas desde el entorno externo en instalaciones de procesamiento de alimentos con el tiempo. La mayoría de las investigaciones sobre la persistencia de la cepa han examinado el papel de la formación de biopelículas y la tolerancia fisiológica a los obstáculos de saneamiento o procesamiento (Buchanan *et al.*, 2017).

Las verdaderas biopelículas consisten en múltiples células y materiales poliméricos extracelulares que protegen a las células individuales del estrés ambiental y fomentan las interacciones entre las células en relación con nutrientes, metabolitos tóxicos y material genético que puede conducir a una mayor supervivencia y crecimiento (Buchanan *et al.*, 2017). En Wageningen, Países Bajos (2013) se encontraron 143 cepas de *L. monocytogenes* que podían formar biopelículas, aunque había una gran diversidad entre las cepas dependiendo de la composición del medio, así como del tiempo y la temperatura (Kadam *et al.*, 2013). En 2014, en San Pablo, Brasil, se analizaron 32 cepas (en su mayoría aisladas de entornos de procesamiento de alimentos, leche y verduras) y se descubrió que casi todas las cepas podían formar biopelículas en superficies de acero inoxidable y vidrio, pero las cepas tuvieron diferencias en su capacidad para formar biopelículas en función de la temperatura y el tipo de superficie (Bonsaglia *et al.*, 2014). Ese mismo año, Ferreira *et al.*, (2014), en Nueva York, EEUU; si bien confirmaron que varias cepas de *L. monocytogenes* fueron capaces de unirse rápidamente a las superficies utilizadas en la elaboración de alimentos, señalaron que faltan pruebas sólidas de la verdadera formación de biopelículas por dicha bacteria en entornos de operación de alimentos. Es posible que *L. monocytogenes* se produzca como parte de biopelículas de múltiples especies en las instalaciones de procesamiento de alimentos.

4.7 *Listeria monocytogenes* en refrigeradores domésticos

Por todas las características mencionadas podemos afirmar que *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir por largos periodos en el ambiente, en plantas elaboradoras de alimentos, en los refrigeradores domésticos y en el propio alimento (FAO, 2009).

En referencia a los refrigeradores domésticos en particular, que motivan la presente investigación, son ambientes donde se ha demostrado que *Listeria monocytogenes* puede estar presente. Se ha comprobado que dicha bacteria es capaz de adherirse a diversas superficies, tales como acero inoxidable, caucho, vidrio y polipropileno,

teniendo la capacidad de formar *biofilms* en los refrigeradores domésticos, siendo una fuente constante de contaminación para los alimentos, teniendo mayor relevancia en los alimentos LPC, quienes no sufrirán un tratamiento térmico posterior (Maktabi *et al.*, 2013).

La presencia de *L. monocytogenes*, reafirma la necesidad de cuidados con la higiene alimentaria en los refrigeradores, tanto en la limpieza de los mismos, como el manejo y almacenamiento de los productos alimenticios (Degenhardt & Fernandes de Almeida, 2008).

Existen estudios internacionales respecto a la detección y la supervivencia de este microorganismo en refrigeradores domésticos. Entre otros, Sergelidis *et al.* (1997), analizaron 136 refrigeradores de uso doméstico en Grecia, con 2 muestras positivas para *L. monocytogenes*. Entre 2001 y 2002 se analizaron 86 refrigeradores domésticos en el norte de Portugal, donde encontraron 9 resultados positivos para *Listeria spp*, de los cuales 3 corresponden a *L. monocytogenes*, 4 a *L. grayi* y 1 a *L. innocua* (Azevedo *et al.*, 2005). En Nashville, EE. UU en el año 2007 se examinaron 137 refrigeradores con el objetivo de detectar *Listeria spp*. Se logró aislar *L. innocua* (4,4%), la cual fue detectada en cajones de carne, contenedores vegetales y en estantes inferiores en algunos refrigeradores (Kilonzo-Nthenge *et al.*, 2008).

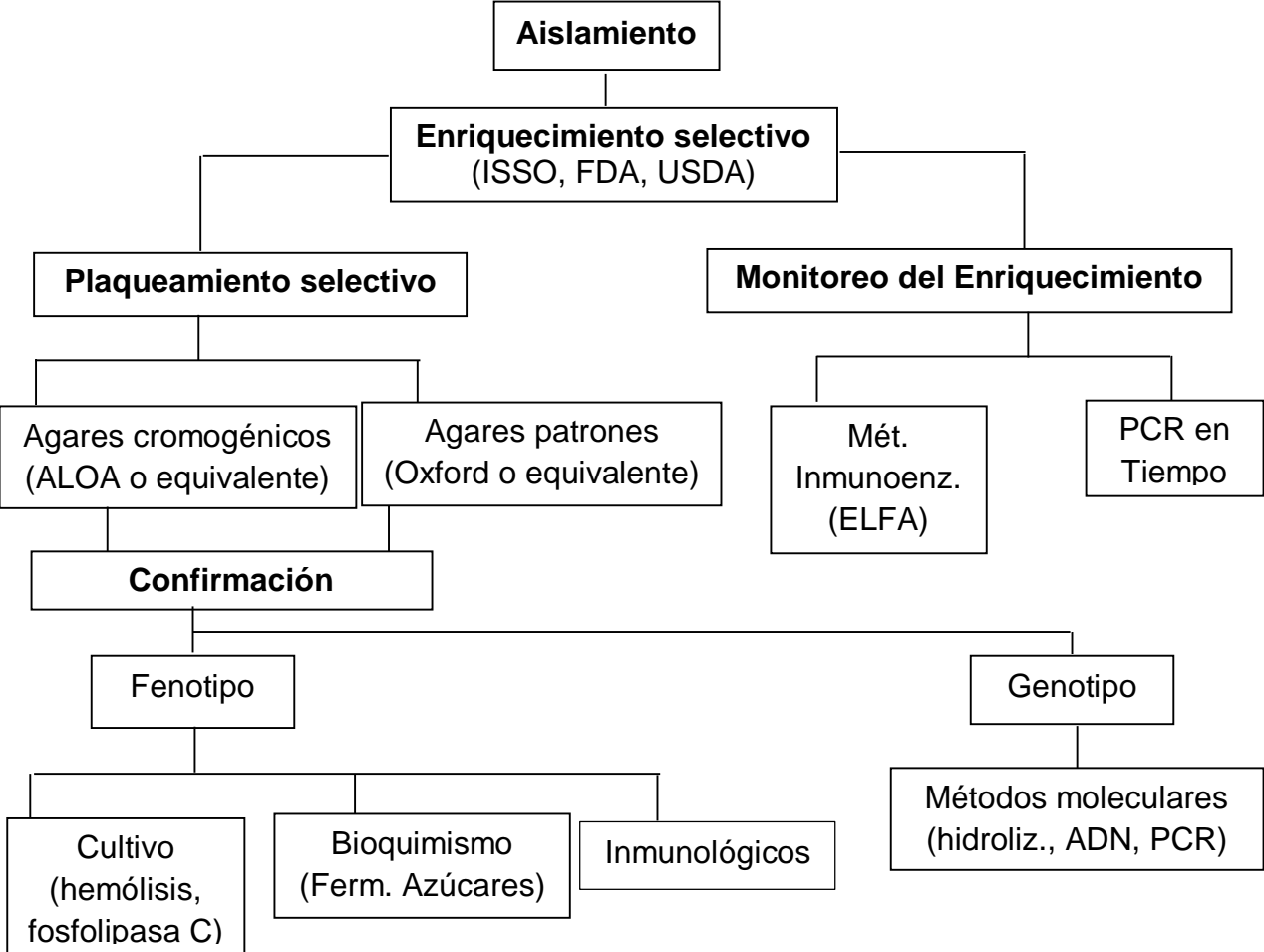
En lo que refiere a nuestro país no se encontraron datos científicos publicados en referencia a la presencia de *Listeria monocytogenes* en refrigeradores domésticos, siendo este un importante motivo para llevar a cabo este trabajo de investigación y así obtener datos al respecto.

4.8 Detección de *Listeria spp* y *L. monocytogenes*

Debido a que *Listeria spp* puede existir en niveles extremadamente bajos en los alimentos y que además se expone a condiciones adversas, como lo es la refrigeración de las muestras, congelación, entre otras; se requieren protocolos de enriquecimiento de muestras para amplificar estas poblaciones iniciales bajas a límites detectables (Donnelly, 2002).

Los métodos convencionales para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de alimentos, aceptados internacionalmente son, el método de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), el método de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), los Estándares ISO 11290-1:2017, el método del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y los Estándares franceses (OIE, 2004).

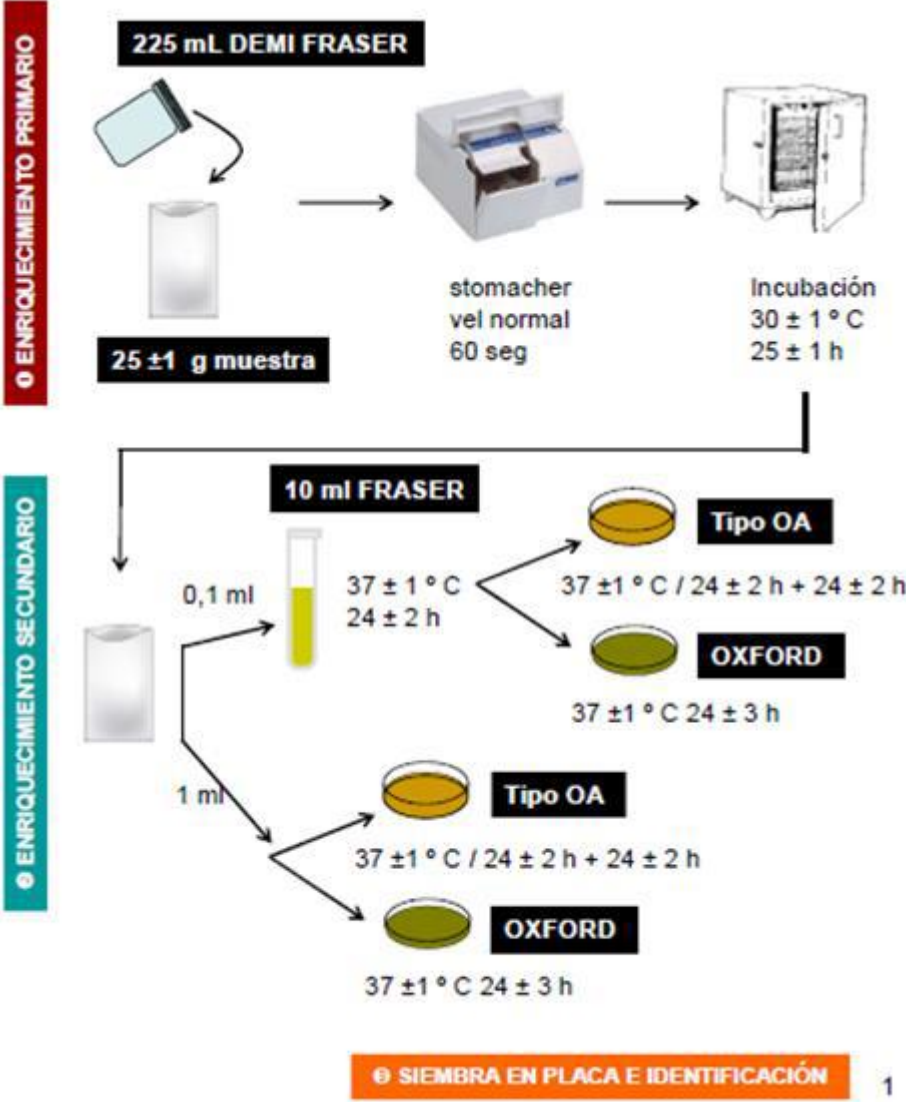
Figura 2. Flujoograma general de los métodos de detección de *L. monocytogenes*

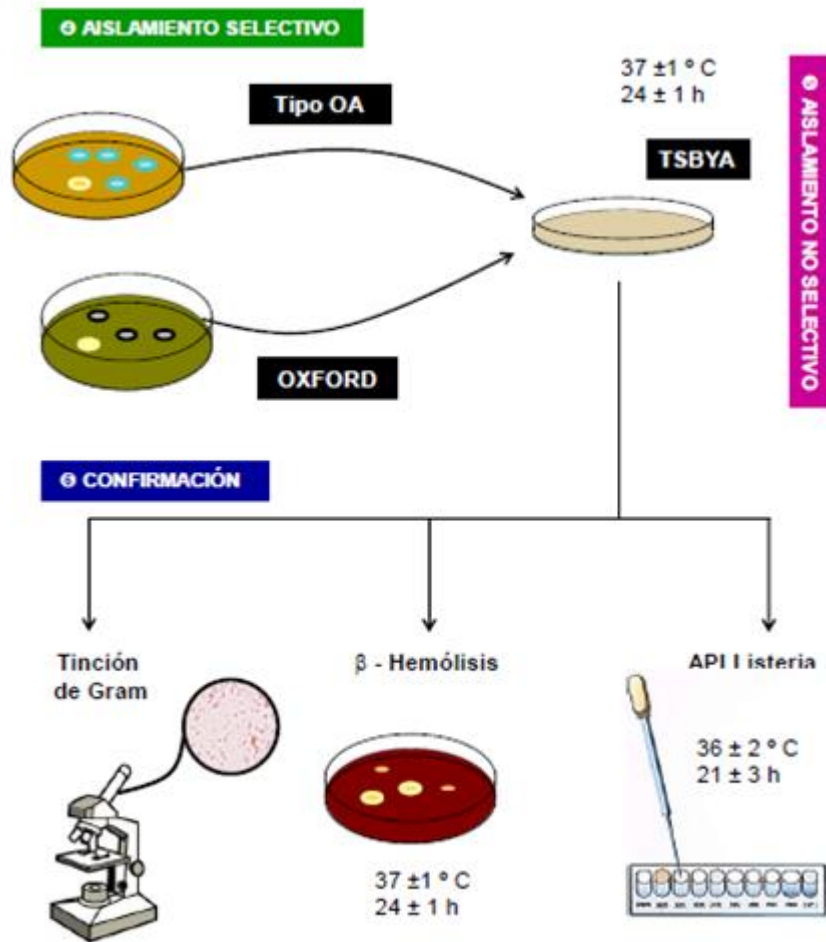


Adaptado de: OIE, 2004

Dichas técnicas tienen algunas variaciones entre sí, pero a grandes rasgos comparten tres grandes etapas, primeramente, el enriquecimiento de la muestra, posterior a ésta, una fase de aislamiento, y finalmente una etapa de identificación. A continuación, presentamos un esquema del método propuesto por la norma ISO 11290-1:2017.

Figura 3. Método horizontal para la detección de *Listeria monocytogenes* según norma ISO 11290-1:2017





Fuente: Adaptado de Norma Internacional ISO 11290-1:2017.

Posterior al aislamiento, se realizan pruebas bioquímicas para identificar las distintas especies dentro del género *Listeria*, las cuales se presentan a continuación.

Tabla 3. Diferenciación de especies de *Listeria* en base a distintas pruebas

Especie	Hemólisis	Producción de ácido		Prueba de CAMP	
		Ramnosa	Xilosa	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>Murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: variable; (+): reacción débil; +: >90% reacciones positivas; -: sin reacción.

Adaptado de: OIE, 2004

Por otra parte, existen:

1) Métodos rápidos de detección de *Listeria*:

- MICRO-ID *Listeria*®
- Sistema de identificación microbiana automatizada Vitek (Vitek Automicrobic System®)
- Métodos inmunológicos de detección rápida
 - Enzimoimmunoensayo colorimétrico monoclonal (*Listeria* –Tek®)
 - Método colorimétrico de detección mediante un enzimoimmunoensayo policlonal (TEC® *Listeria* Visual Immunoassay)
 - Método Assurance® de enzimoimmunoensayo policlonal
 - Ensayo visual de inmunoprecipitación (VIP™)
 - Método de detección mediante ensayo VIDAS LIS®
- Métodos de reconocimiento de los ácidos nucleicos
 - Ensayo GENE-TRAK® para *Listeria*
 - Sistema BAX®
 - Prueba GENE-TRAK® para *Listeria monocytogenes*
 - Prueba confirmatoria Gen-Probe (AccuProbe®) para *Listeria monocytogenes*
 - Método AD713®
- Tipificación
 - Serotipado
 - Fagotipado
 - Electroforesis de enzimas multilocus
 - Análisis de ADN cromosómico mediante endonucleasas de restricción
 - Tipificación basada en la secuencia de los ácidos nucleicos
 - Amplificación aleatoria del ADN polimórfico

2) Pruebas serológicas (ELISA, fijación del complemento, microaglutinación)

(OIE, 2004)

Método cromogénico

CHROMagar™ ha desarrollado un método rápido para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos y superficies, que comprende los siguientes pasos (1) enriquecimiento en medio caldo Fraser durante 24h, (2) aislamiento en CHROMagar™ *Listeria*, (3) confirmación de la especie *Listeria monocytogenes* con CHROMagar™ Identification *Listeria* (CHROMagar™, 2019). Éste, que es el método elegido para el aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en el presente trabajo será descrito con mayor detalle más adelante.

5. HIPÓTESIS

Listeria monocytogenes está presente en refrigeradores domésticos de la ciudad de Montevideo.

6. OBJETIVOS

- **General**

Relevar la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* en muestras de refrigeradores domésticos de la ciudad de Montevideo.

- **Específicos**

Registrar la temperatura y evaluar a través de inspección visual las condiciones de higiene de los refrigeradores domésticos.

Realizar una encuesta a fin de recabar información sobre el conocimiento y la aplicación de prácticas higiénicas durante el almacenamiento de alimentos en el hogar.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el presente estudio se realizó un muestreo aleatorio de 100 refrigeradores domésticos de la ciudad de Montevideo en busca de presencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*. Como se mencionó, *L. innocua* es un indicador de *L. monocytogenes*, al igual que el resto de las bacterias pertenecientes al género, identificamos únicamente estos microorganismos ya que son los que la técnica de aislamiento permite.

Previo al muestreo, se tomó la temperatura del refrigerador con termómetro infrarrojo (marca: Intell Instrument; modelo: AR350), en zona media de pared lateral derecha del mismo, ya que en ésta encontramos la temperatura promedio del refrigerador. Se utilizó como límite máximo de referencia 4.0°C (FDA, CDC, USDA, 2017); así mismo se llevó a cabo una inspección de la misma, se evaluó: higiene y almacenamiento de los alimentos, se tuvo en cuenta la protección de los mismos (con o sin protección a través de envases de distintos materiales); separación de los alimentos crudos y cocidos dentro del refrigerador con el fin de evitar la contaminación cruzada; también se consultaron y se registraron factores relacionados a la higiene del refrigerador, se indagó en la frecuencia, método y productos utilizados en la limpieza del mismo, a través de una encuesta (Anexo 1).

El procedimiento fue llevado a cabo bajo condiciones de asepsia. Para el procedimiento de muestreo y transporte de la muestra, se tomó como guía la metodología y recomendaciones de otros trabajos (Jackson *et al.*, 1993; Norma Internacional ISO 18593:2018).

a. Procedimiento de muestreo

- I. Desinfección de manos.
- II. Medición de temperatura.
- III. Inspección visual de higiene en general.
- IV. Se utilizaron 5 hisopos estériles previamente humedecidos en el medio de transporte (agua peptonada). Se frotó cada hisopo con vigor en 100cm² de las áreas seleccionadas (cajón de verduras, cajón o sitio de almacenamiento de carnes, área de almacenamiento de leche y productos lácteos, superficies del burlete de la puerta). Se introdujeron los hisopos en el frasco con 10ml de agua peptonada, constituyendo ésta la muestra.
- V. Las muestras previamente rotuladas se colocaron en caja isotérmica conteniendo un medio refrigerante. Luego fueron transportadas al laboratorio para realizar el procesamiento en un plazo no mayor a las 12 horas posteriores al muestreo.

b. Encuesta

Se aplicó una encuesta y llenado de formulario con el fin de recabar información relacionada a higienización de la heladera, su frecuencia, producto/s utilizado/s, forma y disposición de los alimentos. Dichos factores se evaluaron para posteriormente asociarlos a la presencia del microorganismo, para determinar si la frecuencia de higiene, los productos utilizados, la forma y disposición de los alimentos, influyen o no en el crecimiento de la bacteria. A partir de estas preguntas se clasificaron las muestras según frecuencia de higienización (menos de un mes/más de un mes); producto/s utilizado/s (detergente/desinfectante/ambos productos); forma de almacenamiento de los alimentos (empacados/sin empaque); disposición de los alimentos (crudos junto a listos para consumir/crudos separados de listos para consumir) (Anexo 1).

c. Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en laboratorio

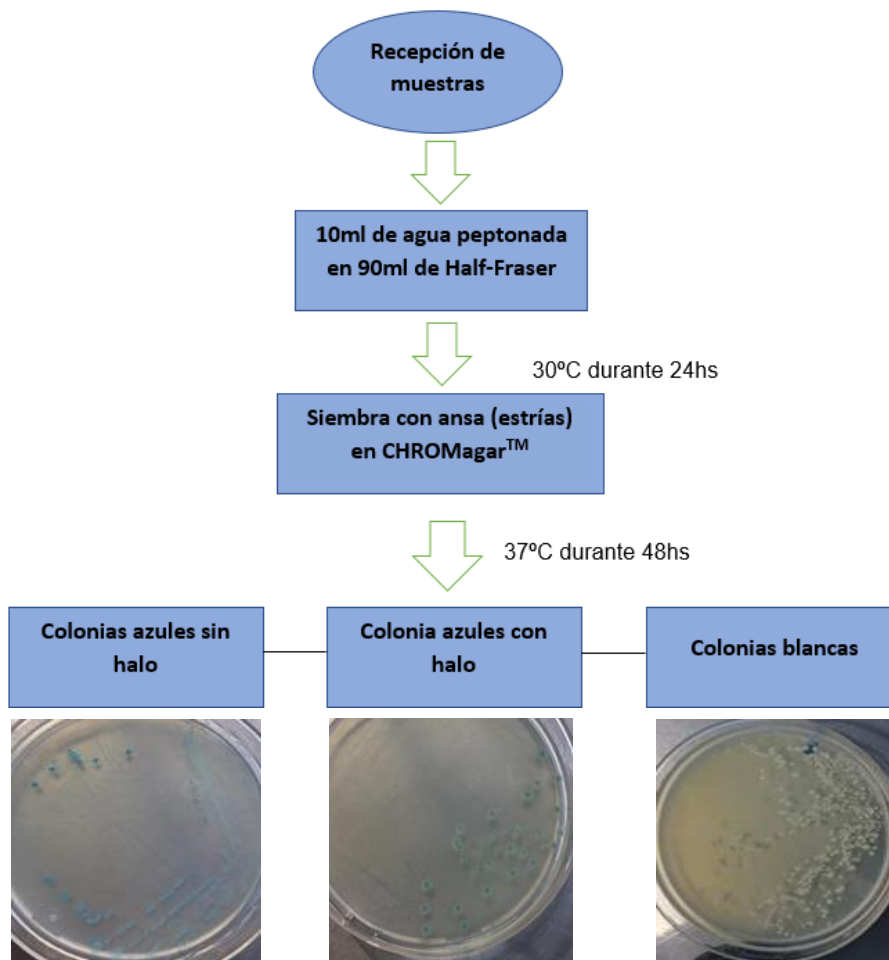
Para la detección y el aislamiento de *L. monocytogenes* se utilizó el medio cromogénico CHROMagar™ Listeria (The Chromogenic Media Pioneer), técnica que fue llevado a cabo en el Laboratorio del Instituto de Investigaciones Pesqueras (IIP) de la Facultad de Veterinaria.

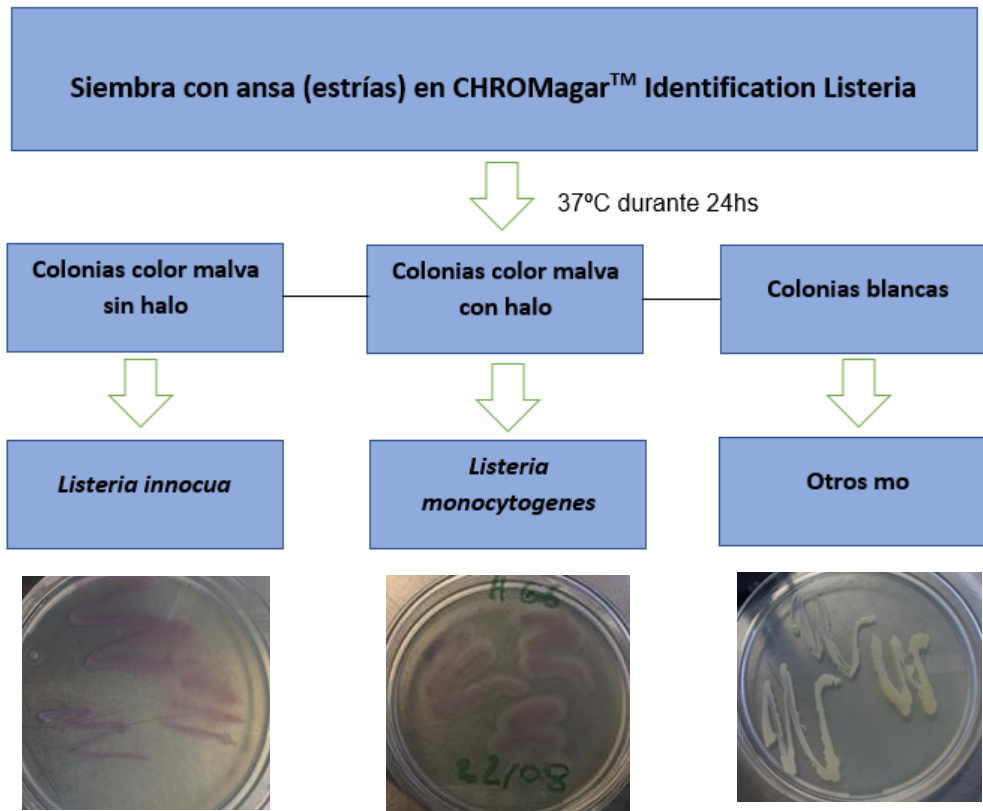
Para la detección de presencia/ausencia de *L. monocytogenes* en muestras ambientales fueron estipulados los siguientes pasos:

1. Enriquecimiento de la muestra, se colocaron los 10ml de agua peptonada junto a los hisopos en 90ml de caldo Half-Fraser, se incubó en estufa a 30°C durante 24hs.
2. Posteriormente, se sembró 0,1ml de la muestra enriquecida en estrías en placa conteniendo medio CHROMagar™ Listeria. Se incubó en estufa a 37°C durante 48hs.

3. Lectura de placas: Colonias azules con halo blanco uniforme se consideraron positivas a *L. monocytogenes*, realizándose su confirmación. Colonias azules sin halo: se consideraron *L. innocua* las cuales también fueron confirmadas. Colonias blancas se consideraron otros microorganismos, realizándose su confirmación.
4. Se realizó confirmación en el medio CHROMagar™ Identification Listeria, se llevó directamente la colonia desde CHROMagar™ Listeria (sin paso de purificación). Se cultivó en estufa a 37°C durante 24hs. Las colonias típicas en este medio se manifestaron con un color malva con halo (presencia de *Listeria monocytogenes*). En el caso de *L. innocua* las colonias identificadas presentaron color malva sin halo. Y para el caso de las colonias blancas, luego de la siembra en CHROMagar™ Identification Listeria, hubo un crecimiento de colonias semejantes a las originales (colonias blancas nuevamente). Estas bacterias se clasificaron dentro del grupo “otros microorganismos” (Figura 4).

Figura 4. Representación esquemática para el aislamiento e identificación de *Listeria*





Adaptado de: CHROMagar™, 2019

d. Análisis estadístico

Para detectar la existencia de factores que puedan estar asociados a la presencia de *Listeria* en superficie de refrigeradores domésticos, se aplicó el test de Chi Cuadrado de Pearson mediante el uso de la herramienta estadística STATA 14.2 (Statistics/Data Analysis). Se evaluó la asociación entre la variable respuesta y las siguientes variables: a) Temperatura de heladera ($\leq 4^{\circ}\text{C}$ / $>4^{\circ}\text{C}$); b) Frecuencia de limpieza (≤ 1 mes / >1 mes); c) Tipo de limpieza (con desinfección / sin desinfección); d) Buenas prácticas en el almacenamiento de alimentos (con protección/sin protección, mediante envases o embalajes).

8. RESULTADOS

De un total de 100 heladeras analizadas en el departamento de Montevideo, *Listeria monocytogenes* se identificó en 4 (4%) y *Listeria innocua* en 22 (22%), destacando que en ninguna heladera se logró identificar ambas especies. Considerando el género, un 26% de los refrigeradores domésticos incluidos en el estudio presentaron *Listeria* en superficie (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen de aislamientos por especie de microorganismo

Agente	N° de resultados	
	+	-
<i>L. monocytogenes</i>	4	96
<i>L. innocua</i>	22	78
<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	26	74
Otros microorganismos	15	85

En relación a la temperatura de refrigeración se encontraron 86 heladeras con una temperatura mayor a 4°C, fuera del límite que se establece como buenas prácticas según la FDA (temperatura máxima de 4°C) (FDA/FSIS, 2014) (Gráfico 1). Por otra parte, estos 86 refrigeradores presentaron diversas temperaturas, para su mejor visualización los agrupamos en 5 grupos (4.1°C-6.0°C con 26 muestras; 6.1°C-8.0°C con 28 muestras; 8.1°C-10.0°C con 20 muestras; 10.1°C-12.0°C con 8 muestras; 12.1°C-14.0°C con 4 muestras) (Gráfico 2).

Gráfico 1. Distribución de refrigeradores según temperatura

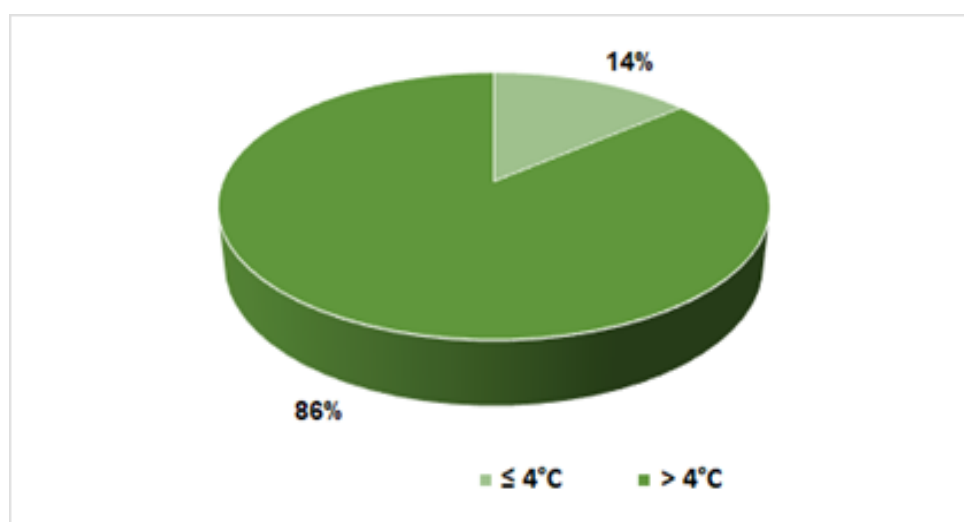
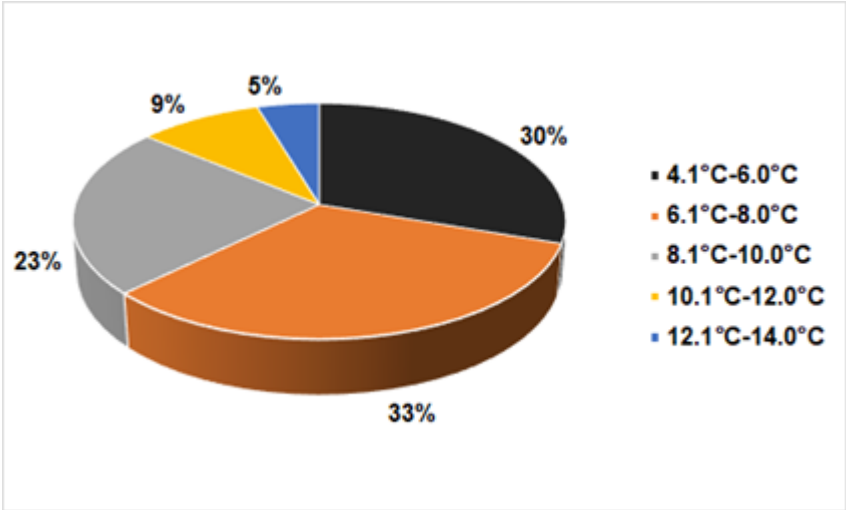


Gráfico 2. Distribución de refrigeradores con temperatura superior a 4°C



Respecto a la higiene, se encontró que el 100% de los refrigeradores muestreados no se higienizaban de forma correcta. Se tuvo en cuenta dos factores, por un lado, el tipo de higiene (uso de detergente, desinfectante o ambos), y por el otro la frecuencia de limpieza y/o desinfección. En los que respecta al primer factor se encontraron 53 heladeras que sólo se limpian con detergente; 13 refrigeradores en los cuales sólo se aplica desinfectante (en 8 heladeras se utiliza hipoclorito de sodio - NaClO y en 5 ácido acético – C₂H₄O₂); y se encontraron 33 refrigeradores en los cuales se utilizan ambos productos juntos (detergente + desinfectante). Esta distribución se muestra en el gráfico 3. Por otra parte, en relación al segundo factor, se encontró que 51 de los refrigeradores son limpiados y/o desinfectados con una frecuencia menor o igual a un mes; mientras que 49 heladeras, con una frecuencia mayor a un mes. Podemos observar esta división en el gráfico 4.

Gráfico 3. Distribución de refrigeradores en relación al tipo de producto de higiene aplicado

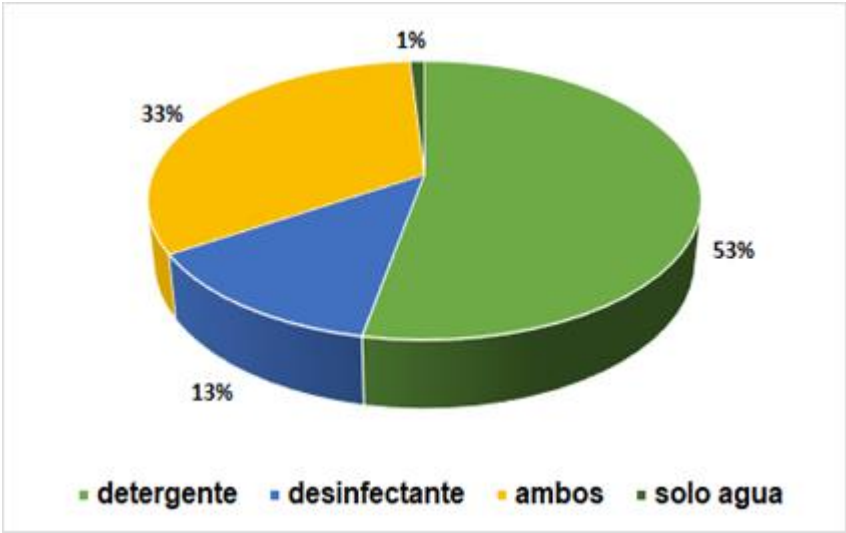
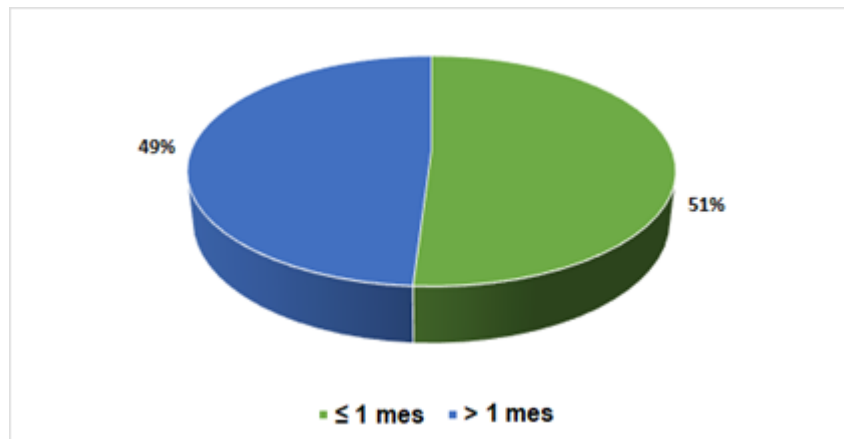


Gráfico 4. Distribución de refrigeradores en relación a la frecuencia de higiene

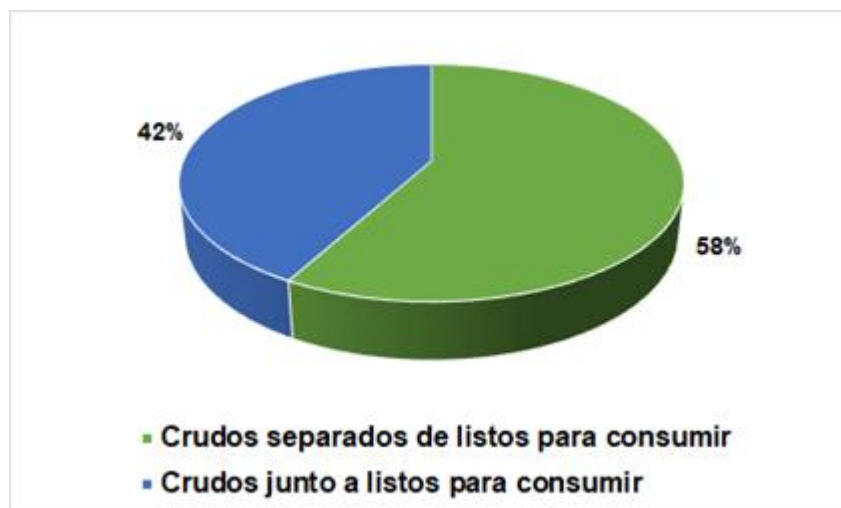


Por otra parte, se visualizaron dos factores en relación al almacenamiento de los alimentos dentro del refrigerador. Se observó la forma en la que éstos se encontraban dispuestos en relación a su protección, es decir cubiertos con algún tipo de material (packs de polietileno, recipientes plásticos, etc.) o sin protección alguna; encontrándose 61 refrigeradores con alimentos empacados, y 39 heladeras con alimentos sin empaque, dicha división la vemos en el gráfico 5. Luego se visualizó la disposición de los alimentos dentro del refrigerador, en lo que refiere a este factor se encontraron 58 heladeras con alimentos crudos separados físicamente de alimentos listos para consumir, y 42 refrigeradores con alimentos crudos junto físicamente a alimentos listos para consumir. Esta distribución la podemos ver en el gráfico 6.

Gráfico 5. Distribución de refrigeradores en relación a la protección de los alimentos



Gráfico 6. Distribución de refrigeradores en relación a la disposición de los alimentos



Se evaluó la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* con relación a la temperatura de las heladeras, frecuencia y tipo de limpieza, y la forma de almacenamiento de los alimentos (con o sin protección).

Primeramente, relacionamos la temperatura de refrigeración con el crecimiento de estas bacterias, obteniendo como resultado lo siguiente: el 100% de las muestras positivas a *Listeria monocytogenes*, 90.9% de las positivas a *Listeria innocua* y el 92.3% de las muestras positivas a ambos microorganismos, fueron obtenidas de refrigeradores con un registro superior a los 4°C (Tabla 5). Por otra parte, cabe destacar que dentro de los resultados positivos para *L. monocytogenes*, encontramos temperaturas de refrigeración de 5.9°C, 7.2°C, 8.3°C y 10.3°C.

Tabla 5. Relación entre *L. monocytogenes*, *L. innocua* y ambos microorganismos con la temperatura del refrigerador

Temperatura	Resultados					
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. innocua</i>		<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	
	+	-	+	-	+	-
≤ 4°C	0	14	2	12	2	12
> 4°C	4	82	20	66	24	62

En cuanto a la temperatura como factor que pueda influir en la presencia de *Listeria* (*L. monocytogenes* + *L. innocua*), el 27,9% de las heladeras que registraron temperaturas superiores a 4°C presentaron *Listeria* en superficie, comparado con el 14,3% de aquellas con una temperatura ambiente ≤ 4°C, sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (valor p>0.05).

Por otro lado, asociamos la frecuencia de limpieza y/o desinfección con la presencia de dichos microorganismos, obteniendo como resultado lo siguiente: el 75% de las muestras positivas a *Listeria monocytogenes*, el 63.6% de las positivas a *Listeria innocua* y el 65.4% de las muestras positivas para ambas bacterias se obtuvieron de refrigeradores con una frecuencia de limpieza y/o desinfección menor o igual a un mes (Tabla 6).

Tabla 6. Relación entre *L. monocytogenes*, *L. innocua* y ambos microorganismos con la frecuencia de limpieza y/o desinfección del refrigerador

Frecuencia de higiene	Resultados					
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. innocua</i>		<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	
	+	-	+	-	+	-
≤ 1 mes	3	48	14	37	17	34
> 1 mes	1	48	8	41	9	40

En referencia a la frecuencia de limpieza, se identificó *Listeria* en el 33.3% de las heladeras que se limpian con una frecuencia mensual o menor y en el 18.4% de aquellas heladeras con una limpieza superior a un mes, no encontrando diferencias estadísticamente significativas (valor $p > 0.05$).

A continuación, asociamos a la presencia de las bacterias, el tipo de higiene realizada en los refrigeradores. Para este factor encontramos un 50% de muestras positivas a *L. monocytogenes*, un 72.7% de positivas a *L. innocua* y un 69.2% de muestras positivas para ambos m.o, se obtuvieron de heladeras en las que solo se aplicaba limpieza (detergente) o desinfección (desinfectante) (Tabla 7).

Tabla 7. Relación entre *L. monocytogenes*, *L. innocua* y ambos microorganismos con el tipo de producto de higiene aplicado al refrigerador

Tipo de higiene	Resultados					
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. innocua</i>		<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	
	+	-	+	-	+	-
Limpieza o Desinfección	2	65	16	51	18	49
Limpieza + Desinfección	2	31	6	27	8	25

En referencia al producto utilizado para la limpieza y/o desinfección, se identificó *Listeria* en el 27.3% de las heladeras que se utiliza un sólo proceso (limpieza o desinfección) y en el 24.2% de aquellas heladeras en las que se aplican ambos

procesos a la vez, no encontrando diferencias estadísticamente significativas (valor $p > 0.05$).

En relación a la protección de los alimentos dentro del refrigerador encontramos que el 50% de las muestras positivas a *L. monocytogenes*, el 54.5% de las positivas a *L. innocua* y el 53.8% de las muestras positivas a ambos m.o, se obtuvieron de refrigeradores donde se almacenaban alimentos sin protección (Tabla 8).

Tabla 8. Relación entre *L. monocytogenes*, *L. innocua* y ambos microorganismos con la protección de los alimentos dentro del refrigerador

Protección de los alimentos	Resultados					
	<i>L. monocytogenes</i>		<i>L. innocua</i>		<i>L. monocytogenes</i> + <i>L. innocua</i>	
	+	-	+	-	+	-
Alimentos sin empaque	2	36	12	26	14	24
Alimentos con empaque	2	60	10	52	12	50

En referencia a la protección de los alimentos, se identificó *Listeria* en el 35.9% de las heladeras que se almacenaba alimento sin protección y en el 19.7% de aquellas en las que se almacenaba alimento con empaque, no encontrando diferencias estadísticamente significativas (valor $p > 0.05$).

9. DISCUSIÓN

La presencia de microorganismos del género *Listeria* se registra en equipos de refrigeración desde hace varios años (Degenhardt & Fernandes de Almeida, 2008). Los datos recopilados en este trabajo permiten observar la presencia de bacterias del género *Listeria* en un 26% de los 100 refrigeradores muestreados, de este porcentaje, 22 muestras presentan *Listeria innocua* (22%) y 4 heladeras son positivas a *Listeria monocytogenes* (4%). En comparación con otras investigaciones, en Montevideo se obtuvieron registros similares de aislamiento de *Listeria spp*, por ejemplo, Sergelidis *et al.* (1997), analizaron 136 refrigeradores de uso doméstico en Grecia, con 2 muestras positivas para *L. monocytogenes*. Entre 2001 y 2002 se analizaron 86 refrigeradores domésticos del norte de Portugal, donde encontraron 9 resultados positivos para *Listeria spp*, de los cuales 3 corresponden a *L. monocytogenes*, 4 a *L. grayi* y 1 a *L. innocua* (Azevedo *et al.*, 2005). En Nashville, EE. UU en el año 2007 se examinaron 137 refrigeradores con el objetivo de encontrar *Listeria spp*, se aisló *L. innocua* (4,4%) en los cajones de carne, contenedores vegetales y en los estantes inferiores en algunos refrigeradores (Kilonzo-Nthenge *et al.*, 2008). En Brasil, se analizaron 60 refrigeradores domésticos, se identificaron dos especies, siendo *L. monocytogenes* la más abundante (5.0%), la otra especie detectada fue *L. ivanovii*

(1.67%) (Degenhardt & Fernandes de Almeida, 2008). Maktabi *et al.*, (2013) analizaron 180 heladeras de uso doméstico en Irán, *L. monocytogenes* estaba presente en 1 refrigerador doméstico y *L. innocua* se aisló a partir de 2 refrigeradores.

Uno de los factores a tener en cuenta para afirmar la presencia de *L. monocytogenes* en las superficies interiores de los refrigeradores es que se asocia principalmente con productos que requieren almacenamiento refrigerado incluyendo paté y carnes, quesos, vegetales crustáceos, mariscos, moluscos y subproductos (Jackson *et al.*, 2007).

Por otra parte, pueden influir en la presencia de este microorganismo, ciertos parámetros, como lo es la temperatura de refrigeración. Como se menciona en la literatura, esta bacteria se considera un microorganismo psicotrófico, capaz de crecer y multiplicarse a bajas temperaturas, lo que, además, implica que los números bajos de células inicialmente contaminantes pueden proliferar en los alimentos dentro del refrigerador (principalmente para los listos para consumir) y representar un riesgo para los consumidores (Jackson *et al.*, 2007). En la presente investigación se registró una temperatura promedio de 6.8°C con una mínima de 0°C y una máxima de 14.0°C, éstas últimas no sólo permiten el crecimiento de *L. monocytogenes* sino también de otros patógenos y organismos del deterioro (Sergelidis *et al.*, 1997). Estos valores son similares a los obtenidos en otros estudios, Geppert (2011) indicó un valor medio de temperatura registrado de 6.7°C en muestras de refrigeradores tomadas en Francia; en Reino Unido y Portugal (2017), la media de las temperaturas promedio en los refrigeradores fue de 6.2°C y 6.4°C, respectivamente, mientras que en Noruega y Rumania en ese mismo año, la media calculada fue de 7.5°C (James *et al.*, 2017); Dumitraşcu *et al* (2020), a partir de 75 refrigeradores analizados obtuvieron un promedio de 6.3°C, también en Francia. Por otra parte, se observó en el presente estudio que el 75% de los refrigeradores tienen temperaturas inferiores a 8,1°C, esto también tiene similitudes con otros trabajos, en Rumania (2017) se detectó que el 75% de los refrigeradores tienen temperaturas de refrigeración inferiores a 9,4°C, mientras que en Noruega (2017), el tercer cuartil se ubica en los 8.3°C; es importante aclarar que, a mayores temperaturas, más alto es el riesgo de contaminación de los alimentos (James *et al.*, 2017).

En relación al límite de temperatura del refrigerador, existen algunas variaciones en distintos estudios, Lagendjk *et al* (2008) establecieron el límite de 4.0°C para los refrigeradores domésticos de Francia, encontraron que 89% de las muestras tomadas provenían de heladeras con temperatura superior a 4.0°C; en Irán, Maktabi *et al* (2013), también determinaron como límite 4.0°C, hallaron un 74.2% de refrigeradores con temperatura mayor a este valor. Sin embargo algunos estudios difieren en dicho límite, en Portugal, Azevedo *et al* (2005), tomaron como límite 6°C, encontraron que un 70% de los refrigeradores muestreados presentaron una temperatura superior a dicho valor; en otros estudios, realizados en el Reino Unido y Francia, alrededor del 70% de los refrigeradores funcionaban a temperaturas superiores a 5.0°C (ANSES, 2017; James & Evans, 1992); Evans (2016) estableció la temperatura de 5.0°C como

límite, halló un 50% de las áreas de almacenamiento central de refrigerador y el 85% de las puertas del refrigerador funcionan a temperaturas superiores al valor límite. En nuestro estudio se estableció como límite el recomendado por la FDA, es decir 4.0°C (FDA, CDC, USDA, 2017), se encontró que el 86% de las heladeras muestreadas presentaron una temperatura superior a este valor, cabe destacar que las mediciones fueron puntuales, y no representan la temperatura media del refrigerador a lo largo de determinado periodo.

Todas las muestras positivas a *Listeria monocytogenes* (100%) y la mayor parte de las positivas a *Listeria innocua* (90,9%) correspondieron a heladeras con temperaturas superiores a 4.0°C. Estos resultados, también, se asemejan a los obtenidos en estudios anteriores, Sergelidis *et al* (1997), Maktabi *et al* (2013), Hong & Lim (2015); encontraron que 100% de las muestras positivas, tanto para *L. monocytogenes* como para *L. innocua*, fueron extraídas de refrigeradores con temperatura superior a 4.0°C. A pesar de estos resultados, los estudios estadísticos llevados a cabo por Sergelidis *et al* (1997), Azevedo *et al* (2005), Maktabi *et al* (2013) y Evans (2016) no encontraron diferencias significativas que consideren la temperatura de refrigeración como un factor influyente en el desarrollo de este microorganismo, esto coincide con los análisis estadísticos realizados en el presente trabajo. Por otra parte, existen estudios que consideran la temperatura de refrigeración junto a las buenas prácticas de higiene, como los factores más importantes para evitar la presencia del patógeno en los refrigeradores domésticos (Evans & Redmond, 2014). Además, considerando que, en condiciones de refrigeración, la mayoría de los microorganismos se inhiben y se reduce el nivel de competencia para la *Listeria* (Degenhardt & Fernandes de Almeida, 2008), los valores obtenidos en esta y otras investigaciones, sugieren que el manejo de la temperatura de los refrigeradores domésticos pudo haber sido un factor que facilitó su desarrollo y persistencia en superficies.

Respecto a la higiene, es un factor muy importante para la presencia de este patógeno en superficies de contacto, debido a la capacidad de la *L. monocytogenes* de formar biofilms cuando los procedimientos de limpieza y desinfección no se realizan en forma adecuada y periódica. Los resultados indicaron que en ninguno de los hogares evaluados se lleva a cabo un correcto procedimiento de higiene de las heladeras, es decir, profunda limpieza seguida de una desinfección (FDA, CDC, USDA, 2017), además debe implicar una rotación de productos utilizados para evitar aparición de resistencias por parte de los microorganismos (Jackson *et al.*, 2007). Esto predispone a la colonización y formación de biopelículas por parte de la *Listeria*, con persistencia en el medio, razón por la cual podría considerarse como otro de los factores asociados a la presencia de la bacteria encontrada en el actual estudio.

Por otra parte, también debemos destacar la frecuencia de higiene de los refrigeradores, como se expresó en resultados, se identificó que el 75% de las muestras positivas a *Listeria monocytogenes* y el 63.6% de las positivas a *Listeria innocua*, proviene de refrigeradores donde la limpieza y/o desinfección se realiza con una frecuencia menor a un mes, cabe recordar que dicha higienización no se lleva a

cabo de forma correcta. Consideramos que tanto el proceso como la frecuencia de higienización de los refrigeradores es muy importante en la presencia de *Listeria*. Varios estudios indican que la higiene de los refrigeradores debe hacerse de forma correcta y con regularidad (Azevedo *et al.*, 2005; Maktabi *et al.*, 2013; FDA, CDC, USDA, 2017).

Otro factor que consideramos, es la protección de los alimentos dentro del refrigerador (con o sin empaque), algunos estudios consideran a ésta una de las causas de la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, debido a la contaminación cruzada entre alimentos contaminados y alimentos listos para consumir (Maktabi *et al.*, 2013; Azevedo *et al.*, 2014). En cuanto a este factor encontramos que en la mayoría de los refrigeradores los alimentos se encuentran protegidos (envueltos). Por otra parte, en relación a los resultados positivos para *Listeria*, se identificó que el 50% de las muestras positivas a *L. monocytogenes* y el 54.5% de las muestras positivas a *L. innocua*, pertenecen a refrigeradores donde los alimentos se almacenan sin protección. Estos alimentos, además de contaminar a otros (por ejemplo, aquellos que están listos para consumir), también implican una fuente de contaminación para el propio refrigerador, esto sumado a una mala higiene de los mismos, y a las altas temperaturas de almacenamiento implica un aumento en el riesgo de contaminación y presencia de bacterias del género *Listeria* en superficie y en los alimentos (Sergelidis *et al.*, 1997).

10. CONCLUSIONES

Este estudio ha demostrado que *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* están presentes en la superficie de los refrigeradores muestreados de la ciudad de Montevideo y por lo tanto suponen un riesgo de contaminación hacia los alimentos.

Un aspecto a resaltar del presente estudio es el hallazgo que en la mayoría de los refrigeradores muestreados no se aplican en forma correcta las Buenas Prácticas de Manipulación de Alimentos, sea por desconocimiento o por costumbre. Esto se vio reflejado por el incorrecto procedimiento de higiene de superficies, el manejo inadecuado de la temperatura y la forma de almacenar los alimentos en los refrigeradores investigados, todos factores que deben ser tenidos en cuenta para minimizar el riesgo para nuestra salud referido a la *Listeria monocytogenes*.

En este sentido es que se confeccionó una cartilla de Buenas Prácticas en el Hogar, dirigido al público en general, a fin de concientizar al consumidor sobre la importancia de mantener la inocuidad de nuestros alimentos (Anexo 2).

11. BIBLIOGRAFÍA

1. ACHIPIA (Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria) (2017). Ministerio de Agricultura, Gobierno de Chile. *Listeria monocytogenes*: Ficha de Peligros N° 04/2017. 9 p. Disponible en: http://www.achipia.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-04-Listeria-v0_1.pdf. Fecha de consulta: 22/11/2019.
2. Acuña, A.M., Alfonso, A., Algorta, G., Anchieri, D., Bentancor, L., Chabalgoity, A., Chiparelli, H., Da Silva, A., Deambrosis, N., Ferrari, A.M., Gadea, P., Gularte, E., Legani, M., Linder, C., Macedo, M., Martínez, A., Mateos, S., Mattera, A., Medina, D., Montano, A., Odizzio, M., Pérez, M., Repiso, M., Rodríguez, G., Salvatella, R., Sabio, M., Schelotto, F., Torres, M., Varela, G., Vicentino, W. (2002) Enfermedades transmitidas por los alimentos en Uruguay. Montevideo. Panalimentos, OPS. 203p.
3. AECOSAN (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición) (2019) Listeriosis. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/listeria.htm Fecha de consulta: 12/11/2019
4. Alcayaga S., Hott B. (2008). Listeria y listeriosis: un desafío de los nuevos tiempos. *Rev Chil Salud Pública*, 12(3): 188-195.
5. Allos B.M., Moore M.R., Griffin P.M y Tauxe R.V. (2004). Surveillance for sporadic foodborne disease in the 21st century: The FoodNet perspective. *Clinical Infectious Diseases*, 38(Suppl 3): S115-S120.
6. ANSES (2017). Étude individuelle nationale des consommations alimentaires 3 (INCA 3). Avis de l'Anses, Rapport d'expertise collective. Disponible en: <https://www.anses.fr/fr/system/files/NUT2014SA0234Ra.pdf> Fecha de consulta: 12/01/2020
7. Azevedo, I., Regalo, M., Mena, C., Almeida, G., Carneiro, L., Teixeira, P., Hogg, T., Gibbs P.A. Incidence of *Listeria* spp. in domestic refrigerators in Portugal (2005). *Food Control*, 16(2): 121-124.
8. Azevedo, I., Albano, H., Silva, J., Teixeira, P. (2014). Food safety in the domestic environment. *Food Control*, 37(1), 272–276.
9. Barón, M. (2018). Inactivación de *Listeria monocytogenes* por calor en condiciones isotérmicas en un entorno ácido (Tesis de Grado). Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica, Universidad Politécnica de Cartagena. Cartagena, Colombia. 89pp. Disponible en: <http://repositorio.upct.es/xmlui/bitstream/handle/10317/6737/tfg-bar-ina.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Fecha de consulta: 19/03/2019.
10. Bell C. and Kyriakides A. *Listeria: A Practical Approach to the Organism and Its Control in Foods*. 2d ed. Ames: Iowa State University Press, 2005.
11. Benadof, D. (2008) Retrato Microbiológico: *Listeria monocytogenes*. *Revista Chilena de Infectología*, 25 (5): 350.
12. Beumer, R. R. Giffel, M.C. Spoorenberg, E., Rombouts, F. M. (1997) *Listeria species* in domestic environments. *Epidemiol. Infect.* 117:437-442.
13. Bonsaglia, E. C. R., Silva, N. C. C., Fernandes Júnior, A., Araujo Júnior, J. P., Tsunemi, M. H., Rall, V. L. M. (2014). Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35:386e391.

14. Bover S., Garriga M. (2014) Condiciones que determinan el crecimiento y la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. 8p.
15. Buchanan, R. L., Gorris, L. G. M., Hayman, M. M., Jackson, T. C., Whiting, R. C. (2017). A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75: 1–1.
16. Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitão, E., Sousa, S., Cabanes, D. (2011) The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence*, 2 (5): 379-394.
17. CDC (2017). Resúmenes anuales de brotes transmitidos por alimentos. Disponible en: <https://www.cdc.gov/fdoss/annual-reports/index.html#tabs-2-7> Fecha de consulta: 04/08/2019.
18. Cole, M.B., Jones, M.V., Holyoak, C. (1990) The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology*, 69 (1): 63-72.
19. Colesterton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999). Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284: 1318 -1322.
20. Charpentier E, Courvalin P. (1997) Emergence of the Trimethoprim Resistance Gene *dfpD* in *Listeria monocytogenes* BM 4293. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1134-1136.
21. Chmielewsky R.A.N., Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:22-32.
22. CHROMagar™ *Listeria* (2019) The Chromogenic Media Pioneer. Control de calidad de alimentos y agua. Disponible en: http://www.chromagar.com/fichiers/1549446695LF_EXT_007_LM_V8.0.pdf?PHPSESSID=68021e3cce9cbbfe5294e7beec609b2b Fecha de consulta: 02/12/2019.
23. Dalton CB, Austin CC, Sobel J, Haves PS, Bibb WF, Graves LM, Swaminathan B, Proctor ME, Griffin PH (1997) An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N Engl J Med* 336:100-105.
24. De Matteis, Vincenzo (2018). Condiciones de inactivación de *Listeria monocytogenes* por tratamiento suave en distintos alimentos. Tesis Universidad Politécnica de Cartagena, 39 p.
25. Uruguay. (2012) Decreto 41/012 del 28 de febrero de 2012. Actualización del código nacional sobre enfermedades y eventos sanitarios de notificación obligatoria. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/41-2012/4> Fecha de consulta: 16/12/2019.
26. Degenhardt, R., Fernandes de Almeida, R. P. (2008). Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em refrigeradores e pias de cozinhas domiciliares nos municípios de ouro, capinzal e zortéa, sc – Brasil. *Tecnologías Para La Competitividad Industrial*, 1(2):24–31.
27. Donnelly, C (2002) Detección y aislamiento de *Listeria monocytogenes* de muestras de alimentos: implicaciones de la lesión subletal. *Journal of AOAC International* 85, (2):495-500.

28. Doyle, M.P. (2001) *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Zaragoza, Acribia 799p.
29. Dumitrașcu, L., Nicolau, A. I., Neagu, C., Didier, P., Maître, I., Nguyen-The, C., Borda, D. (2020). Time-temperature profiles and *Listeria monocytogenes* presence in refrigerators from households with vulnerable consumers. *Food Control*, 111: 107078.
30. Ebe, Y. Hasegawa, G. Takatsuka, H. Umezu, H. Mitsuyama, M. Arakawa, M. Mukaida Naito, M. (1999) The Role of Kupffer Cells and Regulation of Neutrophil Migration Into the Liver by Macrophage Inflammatory Protein-2 in Primary Listeriosis in Mice. *Pathol Int* 49: 519-532.
31. Evans, E. W., Redmond, Y. E. C. (2014). *Una revisión de los estudios de consumo de Seguridad Alimentaria*. 77(3): 510-521.
32. Evans, E. W. (2016). Older adults' domestic kitchen practices associated with an increased risk of listeriosis. *Perspectives in Public Health*, 136(4): 199–201.
33. Fairchild, T. M., Foegeding, P. M. (1993.) A proposed non-pathogenic biological indicator for thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1247 - 1250.
34. FAO. CODEX Disponible en: <http://www.fao.org/3/a1552s/A1552S00.pdf> Fecha de consulta: 15/12/2019.
35. FAO (Food and Agriculture Organization) (2014). Assessment and management of seafood safety and quality. Current practices and emerging issues. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper, Nº 574. 432p.
36. Farber, J. M., and Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, 55 (3):476–511.
37. FDA/FSIS (2011) Caracterización de peligros, relación entre la dosis y la respuesta. Disponible en: <http://www.fao.org/3/y5393s0a.htm>. Fecha de consulta: 12/07/19
38. FDA (Food and Drug Administration) (2012). Bad Bug Book, 2ª ed. APPENDIX 7: Bacterial and Viral Pathogens of Greatest Concern in Seafood Processing - Public Health Impacts. pp 451-454.
39. FDA/FSIS, Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products (2014). Disponible en: <https://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/d3373299-50e6-47d6-a577-e74a1e549fde/Controlling-Lm-RTE-Guideline.pdf?MOD=AJPERES> Fecha de consulta: 10/01/2020.
40. FDA, CDC, USDA (2017) Manipulación especial para alimentos refrigerados listos para consumir. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/78644/download> Fecha de consulta: 19/12/2019.
41. Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., Stasiewicz, MJ (2014) *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J Food Prot* 77(1):150-170.
42. Fuster, N. (2006). *Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas Tesis Universidad Autonoma de Barcelona*. 160 p.
43. Geppert, J. (2011). Modelling of domestic refrigerators' energy consumption under real life conditions in Europe. Tesis University of Bonn, Shaker Verlag.

44. Golovlev E.L. (2002). The Mechanism of Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Type of Structured Population. *Microbiology*, 71 (3):249-254.
45. Gregory S. H, Wing E. J. (1990) Accessory Function of Kupffer Cells in the Antigen Specific Blastogenic Response of an L3T4+ T-lymphocyte Clone to *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 58: 2313-2319.
46. Hong, J., Lim, S.-Y. (2015). Microbial Contamination in Kitchens and Refrigerators of Korea Households. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 30(4):303–308.
47. ICMSF. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (1998) *Microorganismos de los alimentos 5 Características de los patógenos microbianos*, Zaragoza, Acribia.
48. Intendencia de Montevideo (2014) *Listeria monocytogenes*. Disponible en: <http://montevideo.gub.uy/areas-tematicas/salud/listeria-monocytogenes>. Fecha de consulta: 21/10/2019
49. ISO. Norma ISO 11290:2017, detección y recuento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp*: análisis de cambios por el centro nacional de alimentación. Disponible en: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/laboratorios/Norma_ISO_11290.pdf Fecha de consulta: 18/12/2019
50. ISO. Norma ISO 18593:2018. Microbiología de la cadena alimentaria. Métodos horizontales para el muestreo de superficie. Disponible en: <https://www.une.org/encuentra-tu-norma/busca-tu-norma/norma?c=N0061633> Fecha de consulta: 20/12/2019
51. Jackson, T.C., Acuff, G.R., Lucía, L.M., Prasai, R.K., Benner, R.A., Terry, C.T. (1993). Survey of Residential Refrigerators for the Presence of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 56(10): 874-875.
52. Jackson, V., Blair, E. S., Mcdowell, D. A., Kennedy, J., Bolton, D. J. (2007). La incidencia de patógenos transmitidos por alimentos importantes en refrigeradores domésticos. *Food Control*, 18(4): 346–351.
53. James, S. J., Evans, J. (1992). Consumer handling of chilled foods - temperature performance. *International Journal of Refrigeration*, 15:299–306.
54. James M. (2009) *Microbiología Moderna de los Alimentos*. 5ª. Ed. Madrid, Acribia, 788 p.
55. James, C., Onarinde, B. A., James, S. J. (2017). The use and performance of household refrigerators: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1):160–179.
56. Jay J, Loessner M, Golden D. (2005) *Microbiología Moderna de los Alimentos*. ed.5ª, Acribia, Zaragoza España.
57. Kadam, S. R., den Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., Abee, T. (2013). Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology*, 165, 259e264
58. Kilonzo-Nthenge, A., Chen, F., Godwin, S.L. (2008). Occurrence of *Listeria* and *Enterobacteriaceae* in Domestic Refrigerators. *Journal of Food Protection*, 71(3): 608-612.

59. Kopper, G., Calderón, G., Schneider, S., Domínguez, W., Gutiérrez, G. (2009). Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. *Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación*, 6:194.
60. Kraigsley A., Ronney P.D., Finkel S.E. (2002). Dynamics of self propagating fronts of motile bacteria. Disponible en: <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/BacterialFronts.html> Fecha de consulta: 12/10/2019
61. Kumar C.G., Anand S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1-2):9-27.
62. Lagendijk, E., Assere, A., Derens, E., Carpentier, B. (2008). Domestic refrigeration practices with emphasis on hygiene. *Journal of Food Protection*, 71(9), 1898–1904.
63. LATU. INNOTEC. (2018) Efecto de la aplicación de ácido láctico sobre *Listeria monocytogenes* en carne envasada al vacío en Uruguay. 15. 7-14p.
64. Low J. C., Donachie W. (1997) A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *Vet J*; 153: 9-29.
65. Maktabi, S., Jamnejad, A., Faramarzi, K. (2013). Contamination of household refrigerators by *Listeria* species in Ahvaz, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(3):301–305.
66. MSP (2017). Boletín epidemiológico. 35 p. Disponible en: http://www.msp.gub.uy/sites/default/files/archivos_adjuntos/Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20Mayo%202017.7%20corregido%20por%20Quian%20_1_.pdf. Fecha de consulta: 30/05/2019.
67. MSP (2019) División de Epidemiología-Departamento de Vigilancia en Salud. Distribución de casos de Listeriosis según año, sexo, lugar de residencia, edad y evolución. Uruguay periodo 2010 - 2018. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/tematica/boletines-epidemiologicos> Fecha de consulta: 16/12/2019.
68. Muñoz, A. I., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., Guzmán, V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. *Biomédica* 31:428-439.
69. Noriega R. LM, Ibáñez V. S, González A. P, Yamamoto C. M, Astudillo D. J, González V. M. (2008) Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. *Rev Chilena Infectol*. 25(5):342-9.
70. OIE (2004) Manual de la OIE sobre animales terrestres. *Listeria monocytogenes*. Capítulo 2.10.14. 1222-1237.
71. OMS (2019) Principales enfermedades transmitidas por los alimentos y sus causas. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Fecha de consulta: 21/10/2019.
72. Oteo, J Alós, J. I. (2018) *Listeria* y listeriosis. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Móstoles. Madrid. 4p.
73. Paciel D., Medina J. (2016). Enfermedad por *Listeria monocytogenes*: minireview, listeriosis invasiva en adultos. Montevideo: UdelaR, Facultad de Medicina. 8 pp.
74. PAHO (2015) Enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) *Inocuidad de Alimentos - Control Sanitario - HACCP*. Disponible en: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10836:201

[5-enfermedades-transmitidas-por-alimentos-eta&Itemid=41432&lang=en](#) Fecha de consulta: 03/11/2019.

75. Rocourt, J., Buchrieser, C. (2007) The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy, and identification. En: Ryser Elliot T, Marth Elmer H (Eds.) *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. 3 a ed. Florida. CRC, pp 1-20.
76. Rossi, M.L., Paiva, A., Tornese, M., Chainelli, S., Troncoso, A. (2008) Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. *Revista Chilena de Infectología*, 25 (5): 328-335.
77. Scallan, E.; Hoekstra, R.M.; Angulo, F.J.; Tauxe R.V.; Widdowson, M.A.; Roy, S.L. Griffin, P.M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States--major pathogens. *Emerg Infect* 17(1):7-15.
78. Schlech, W. F., Acheson, D. (2000). Foodborne Listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, 31(3):770-775.
79. Sergelidis, D., Abraham, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, P., Genigeorgis, C. (1997). Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. *International Journal of Food Microbiology*, 34: 171-177.
80. Shineman, T.L., Harrison, M.A. (1994). Growth of *Listeria monocytogenes* on different muscle tissues, *Journal of Food Protection*, 57: 1057-62.
81. Suárez R., Idiarte L., Franchi R., Pereira L., Darrigol J., Moraes M., Baldovino R., Guerra M., Fernández A. (2017). Listeriosis Invasiva. Presentación de un caso clínico y revisión de la literatura. *Arch Pediatr Urug*, 88(5): 274-278.
82. Sutherland I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147: 3 9.
83. Tejera D., Alonso F., Silva M., Modernel J., Limongi G., Bertullo M., Villalba F., Cancela M. (2015). Listeriosis Invasiva en Unidades de Terapia Intensiva: revisión de una serie de casos. *An Facultad Med. (Univ Repúb Urug)*, 2(1): 62-69.
84. Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., Mercado, M. (2005) Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Revista MVZ Córdoba*, 10 (1): 511-543.

12. ANEXOS

Anexo N° 1. Encuesta realizada en los hogares.



PLANILLA

Número de muestra:

Fecha:

Temperatura:

ENCUESTA

1) ¿Limpia su heladera?

SI	NO
----	----

2) ¿Con qué frecuencia?

Quincenal	Mensual	Más de un mes
-----------	---------	---------------

3) ¿Con qué limpia?

Detergente	Desinfectante	Ambos
------------	---------------	-------

4) Inspección del almacenamiento

- Con empaque / sin empaque
- Crudos separados de listos para consumir
- Crudos junto a listos para consumir

5) Observaciones:

Anexo N°2. Procedimiento de toma de muestras.


- I. Desinfección de manos.
- II. Se procedió a tomar la temperatura de heladera mediante el uso de un termómetro infrarrojo (marca: Intell Instrument; modelo: AR350), la cual fue tomada en forma genérica en la pared lateral derecha.
- III. Inspección: se evaluó la forma de almacenamiento de alimentos (con o sin empaque), contacto entre alimentos crudos y cocidos, higiene general.
- IV. Se utilizaron 5 hisopos estériles previamente humedecidos en el medio de transporte (agua peptonada). Se frotaron con vigor las áreas seleccionadas (100cm²) utilizando toda la superficie del hisopo, se cortó el cabo con una tijera (desinfectada) y se introdujeron los hisopos en el frasco con 10ml de agua peptonada, constituyendo ésta la muestra. Las superficies seleccionadas para la toma de muestra fueron: cajón de verduras, cajón o sitio de almacenamiento de carnes, área de almacenamiento de leche y productos lácteos, superficies del burlete de la puerta. Preferentemente se seleccionaron superficies con mayor humedad o con presencia de líquidos (Beumer *et al.*, 1997).
- V. Las muestras previamente rotuladas se colocaron en caja isotérmica conteniendo un medio refrigerante. Luego fueron transportadas al laboratorio para realizar el procesamiento en un plazo no mayor a las 12 horas posteriores al muestreo. Todo el procedimiento fue llevado a cabo bajo condiciones de asepsia.

Anexo N°3. Folleto informativo acerca de la correcta manipulación de los alimentos dentro del refrigerador.

3

Limpiar... el refrigerador

Limpie su refrigerador con regularidad.
Limpie inmediatamente cualquier derrame.
Esto es especialmente importante, para que la *Listeria* no tenga un lugar donde crecer y propagarse a otros alimentos.
Limpie las paredes interiores y los estantes con agua caliente y detergente luego realice una desinfección con vinagre o hipoclorito de sodio.



4


Mantener los alimentos envasados y correctamente almacenados...

Mantenga los alimentos correctamente envasados, ya que éstos son la principal fuente de contaminación de *Listeria* al refrigerador. Limpie los envases antes de introducir el alimento al refrigerador.
Evite mezclar los alimentos crudos con los cocidos.
Forma de almacenar dentro del refrigerador:
Zona alta: alimento envasado
Zona media: lácteos y embutidos
Zona baja: carnes y pescado
Cajones: frutas y verduras
Puerta: bebidas, mantequilla, huevos



Manipulación de alimentos Refrigerados

Cómo prevenir la listeriosis??



Qué es la listeriosis??

Quizás escuchó o leyó algo acerca de la listeria en los medios de comunicación.

- Se trata de bacterias transmitidas por los alimentos
- pueden crecer a temperaturas de refrigeración
- provocan la listeriosis, una enfermedad que puede ser particularmente nociva para los grupos en riesgo
- tales como mujeres embarazadas y sus bebés no nacidos, recién nacidos, adultos mayores y otras personas con sistemas inmunitarios debilitados (como personas con VIH/SIDA, cáncer, diabetes, enfermedad renal y pacientes trasplantados).

¡¡PERO HAY UNA BUENA NOTICIA: EXISTEN ALGUNAS FORMAS SIMPLES PARA QUE LOS CONSUMIDORES REDUZCAN EL RIESGO DE LISTERIOSIS!!

REDUCIR LOS RIESGOS DE LA LISTERIA TRANSMITIDA POR LOS ALIMENTOS ES MUY SENCILLO, SOLO DEBEMOS...

1

Enfriar.. a la temperatura adecuada...

Su refrigerador debe estar a una temperatura de 4 °C o menos y el congelador debe estar a una temperatura de -18 °C. Coloque un termómetro en el refrigerador y tome la temperatura en forma periódica. Ajuste el control de temperatura si es necesario.



2

Usar... los alimentos listos para consumir, ¡LO ANTES POSIBLE!

Utilice los alimentos refrigerados listos para consumir lo antes posible. Cuanto más tiempo estén en el refrigerador, más oportunidades tendrá la listeria para crecer.



Anexo N° 4. Resultados positivos en los distintos aislamientos.

Figura 5. Muestra positiva de *Listeria spp* en CHROMagar™ Listeria



Figura 6. Muestra positiva de *L. innocua* en CHROMagar™ Listeria



Figura 7. Muestra positiva de *L. monocytogenes* en CHROMagar™ Listeria

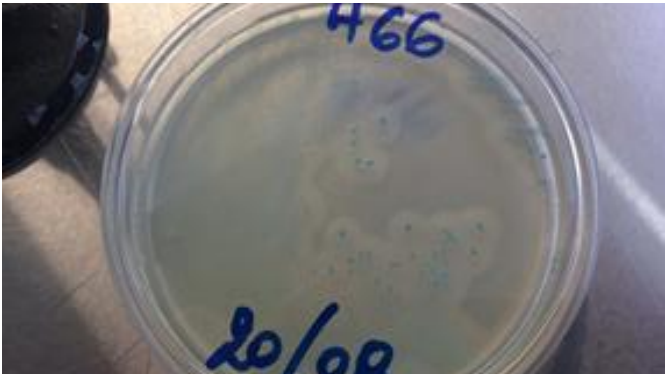


Figura 8. Muestra positiva de *Listeria spp* en CHROMagar™ Identification Listeria



Figura 9. Muestra positiva de *L.innocua* en CHROMagar™ Identification Listeria



Figura 10. Muestra positiva de *Listeria monocytogenes* en CHROMagar™ Identification Listeria

