



<b>Directrices para la verificación del muestreo de <i>Listeria monocytogenes</i> en zonas de trabajo y equipos utilizados en la producción de alimentos listos para el consumo</b>	<b>Versión 1</b>
---	------------------

Aprobado en la Comisión Institucional del 16/12/2020

## 1. INTRODUCCIÓN

El género *Listeria* pertenece a una familia de bacterias (*Listeriaceae*) compuesta de diecisiete especies. Una de ellas, *Listeria monocytogenes*, es la especie patógena para el hombre y provoca la listeriosis, enfermedad que afecta tanto a seres humanos como a animales.

Aunque la listeriosis es poco frecuente en comparación con otras zoonosis de transmisión alimentaria, la enfermedad suele ser grave con altas tasas de hospitalización y mortalidad. De acuerdo con la última información publicada por EFSA\*, durante el año 2018 hubo 2549 casos de listeriosis humana en la Unión Europea, con una tasa de hospitalización del 97% y con 229 muertes, lo que implica una tasa de mortalidad del 15,6%. En España, en ese mismo año, hubo 432 casos confirmados. Posteriormente entre agosto y septiembre de 2019 ha tenido lugar el brote de listeriosis más importante registrado en España, asociado al consumo de carne mechada, afectando a 216 personas.

En los últimos 10 años y, tanto en la UE como en España, se confirma una tendencia al alza estadísticamente significativa. Además, desde el año 2015, es una enfermedad de declaración obligatoria en nuestro país, lo que supone una importante mejora en la notificación de casos. Sin embargo, los brotes son difíciles de investigar, debido al largo periodo de incubación de la listeriosis (5-70 días), que dificulta el estudio de los alimentos consumidos por los enfermos.

El consumo de alimentos o piensos contaminados es la principal vía de transmisión a los seres humanos y los animales. El agente causal se encuentra ampliamente distribuido en el medio ambiente (suelo, plantas y agua), siendo altamente contaminante en plantas procesadoras de alimentos. Esta bacteria puede ingresar en las plantas de alimentos mediante la tierra proveniente de los zapatos y la vestimenta del personal que trabaja en la fábrica, así como en el transporte utilizado, por medio de animales que excreten la bacteria o tengan la piel contaminada y mediante vegetales crudos contaminados. Una vez ingresa en la industria puede llegar al producto por medio de los manipuladores, las superficies de contacto, los equipos y útiles de contacto o el propio ambiente.

A diferencia de muchas otras bacterias transmitidas por los alimentos, *Listeria* tiene características únicas y específicas, ya que es resistente a altas concentraciones de sal y a la acidez, pudiendo incluso multiplicarse a temperaturas de refrigeración. Puede crecer en ambientes aeróbicos, micro-aerofílicos y anaeróbicos (al vacío).

\*(The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks 2018)



Esta capacidad le permite mantener la viabilidad en los alimentos que se conservan a bajas temperaturas. Además, es persistente en el medio ambiente industrial por su marcada tendencia a permanecer acantonada y protegida formando biofilms.

La resistencia y persistencia de esta bacteria dificultan su eliminación, que, junto con las altas tasas de mortalidad en los seres humanos, hacen que los operadores deban establecer un plan de control que garantice la seguridad de los alimentos elaborados.

En las personas infectadas, los síntomas varían desde síntomas gripales leves, tales como náuseas, vómitos y diarrea, a infecciones más graves, como abortos, meningitis o septicemia. Las personas que son más susceptibles de padecer listeriosis son las que presentan sistemas inmunológicos débiles, las mujeres embarazadas, los lactantes y las personas de edad avanzada.

*Listeria monocytogenes* se puede encontrar en muchos alimentos, como por ejemplo el pescado ahumado, embutidos, carnes, quesos y verduras crudas. El *Reglamento (CE) nº 2073/2005, de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios* establece criterios microbiológicos para este germen en los alimentos listos para el consumo (alimentos destinados por el productor o el fabricante al consumo humano directo sin necesidad de cocinado u otro tipo de transformación eficaz para eliminar o reducir a un nivel aceptable los microorganismos peligrosos).

Para prevenir la contaminación de los alimentos con esta bacteria, es fundamental seguir las buenas prácticas de fabricación, prácticas de higiene y el control efectivo de la temperatura en toda la cadena de producción alimentaria, incluyendo la distribución y el almacenamiento de alimentos. Debe evitarse la contaminación cruzada previa al envasado y controlar tanto las fuentes y vías de la contaminación por *Listeria monocytogenes*, como su crecimiento en el producto hasta el final de su vida útil.

## **2. BASE LEGAL Y DOCUMENTOS DE REFERENCIA**

El Reglamento (CE) nº 2073/2005, establece, para aquellos establecimientos que elaboren alimentos susceptibles de plantear un riesgo de *Listeria monocytogenes* para la salud pública, el requisito de tomar muestras de las zonas de producción:

### ***“Artículo 5. Normas específicas para las pruebas y la toma de muestras***

*.... 2. Se tomarán muestras en las zonas de trabajo y el equipo utilizados en la producción de los productos alimenticios cuando tal toma de muestras sea necesaria para garantizar el cumplimiento de los criterios. En este proceso de toma de muestras se utilizará como método de referencia la norma ISO 18593.*

*Los explotadores de las empresas alimentarias que produzcan alimentos listos para el consumo susceptibles de plantear un riesgo de *Listeria monocytogenes* para la salud pública deberán tomar siempre muestras de las zonas y el equipo de producción, como parte de su plan de muestreo, con el fin de detectar la posible presencia de dicha bacteria...”*



En el Capítulo 1 del Anexo I de dicho Reglamento, define criterios de seguridad alimentaria para 3 categorías de alimentos en relación con *Listeria monocytogenes*:

Categorías de alimentos	Plan de toma de muestras		Límites		Método analítico de referencia	Fase en la que se aplica el criterio
	n	c	m	M		
1.1 Alimentos listos para el consumo destinados a lactantes, y alimentos listos para el consumo destinados a usos médicos especiales (4)	10	0	No detectado en 25 g		EN/ISO 11290-1	Productos comercializados durante su vida útil
1.2 Alimentos listos para el consumo que puedan favorecer el desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales	5	0	100 ufc/g(5)		EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil
	5	0	NO detectado en 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Antes de que haya dejado el control del explotador de la empresa que lo ha producido.
1.3 Alimentos listos para el consumo que no puedan favorecer el desarrollo de <i>Listeria monocytogenes</i> , que no sean los destinados a los lactantes ni para usos médicos especiales (4), (8)	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2	Productos comercializados durante su vida útil

Hay que tener en cuenta que el propio Reglamento contiene notas aclaratorias (4, 5, 7 y 8) respecto a dichos criterios que deben ser tenidas en cuenta a la hora de aplicarlos:

*“(4) En circunstancias normales, no se exige realizar pruebas regulares con respecto a este criterio para los siguientes productos alimenticios listos para el consumo:*

- *Los que hayan recibido tratamiento térmico u otro proceso eficaz para eliminar *L. monocytogenes*, cuando la recontaminación no sea posible tras este tratamiento (por ejemplo, productos tratados térmicamente en su envase final).*
- *Frutas y hortalizas frescas, enteras y no transformadas*
- *Pan, galletas y productos similares.*
- *Aguas embotelladas o envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares.*
- *Azúcar, miel y golosinas, incluidos productos de cacao y chocolate.*
- *Moluscos bivalvos vivos.*
- *Sal de cocina.*



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

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

(8) *Se considera automáticamente que pertenecen a esta categoría los productos con  $pH \leq 4,4$  o a  $w \leq 0,92$ , productos con  $pH \leq 5,0$  y  $aw \leq 0,94$ , y los productos con una vida útil inferior a 5 días. Otras categorías de productos también pueden pertenecer a esta categoría, siempre que se justifique científicamente.”*

Asimismo, el Laboratorio Comunitario de Referencia para *L. monocytogenes*, “French Agency for Food, Environmental and Occupational Health safety, “ANSES,” publicó el documento “*Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of Listeria monocytogenes Version 3 – 20/08/2012*”, del cual se adjunta versión traducida como anexo al procedimiento.

### **3. OBJETIVO DEL DOCUMENTO**

Proporcionar una herramienta técnica de utilidad a las autoridades competentes para la verificación del cumplimiento del Reglamento (CE) N° 2073/2005, en lo relativo al muestreo oficial y a la verificación de la toma de muestras por parte de los operadores de la industria alimentaria, en zonas de trabajo y equipos de líneas de producción de alimentos listos para el consumo, que pueden plantear riesgo de *Listeria monocytogenes* y las actuaciones consiguientes.

### **4. ÁMBITO DE APLICACIÓN**

El ámbito de aplicación será el de los alimentos susceptibles de plantear un riesgo de *Listeria monocytogenes* para la salud pública y estos se encuentran definidos en el Capítulo I. “Criterios de Seguridad Alimentaria” del Reglamento (CE) n° 2073/2005, en las Categorías de alimentos 1.1, 1.2 y 1.3. En la nota al pie de página (4) de este mismo capítulo se indican una serie de alimentos a los que no se exige, en circunstancias normales, realizar pruebas regulares con respecto a este criterio y en la nota al pie de página (8) se enumeran categorías de productos con características bioquímicas o de vida útil que no favorecen el desarrollo de *Listeria monocytogenes*. Estos alimentos son los siguientes:

- Actividad de agua  $\leq 0.92$
- $pH \leq 4.4$
- $pH \leq 5$  y actividad de agua  $\leq 0.94$



- Productos de una vida útil inferior a 5 días excepto cuando poseamos evidencias que no nos permitan descartar el riesgo.
- Productos que han recibido un tratamiento térmico eficaz para eliminar *Listeria monocytogenes* y cuya recontaminación posterior no es posible.
- Frutas y hortalizas frescas enteras y no transformadas, azúcar, miel, golosinas, productos de cacao y chocolate, pan, galletas y productos similares, aguas embotelladas y envasadas, bebidas refrescantes sin alcohol, cerveza, sidra, vino, bebidas espirituosas y productos similares, moluscos bivalvos vivos y sal de cocina.

De aquí se desprende que es necesaria una rigurosa caracterización de los productos. La descripción de los productos es una tarea preliminar del APPCC, individualizada y no genérica. Debe incluir esos parámetros físico-químicos de forma representativa con analíticas suficientes. También, en su caso, estarán bien justificadas las garantías de esa imposibilidad de recontaminación. En el caso de los reenvasadores, se evaluará su riesgo para saber si son susceptibles y deben someterse a muestreo. Del mismo modo serán necesarias garantías de que los procesos de elaboración se siguen escrupulosamente respetando temperaturas, tiempos y demás parámetros y bajo el control de puntos de control crítico u otros puntos de control.

Teniendo en cuenta los datos epidemiológicos, los de control oficial, el tipo de manipulación probablemente realizada y atendiendo a las normales características de los productos, se han considerado como susceptibles de plantear un riesgo por contaminación de *Listeria monocytogenes* los fabricantes, envasadores y minoristas que elaboren, loncheen, corten y/o fraccionen alguno de los siguientes alimentos listos para el consumo, excepto cuando el operador económico justifique que sus productos cumplen con las características establecidas anteriormente:

1. Productos de la pesca ahumados
2. Productos cárnicos listos para el consumo
3. Quesos
4. Platos preparados
5. Ensaladas de frutas y/u hortalizas.
6. Productos destinados a lactantes y usos médicos especiales
7. Vegetales congelados

No se trata de un listado cerrado, por lo que se podrá incluir cualquier otro que se determine, tanto por el control oficial como por los propios operadores, en base a su proceso de fabricación, posibilidad de contaminación cruzada, volumen de producción o cualquier otra circunstancia.

Esta clasificación vendrá condicionada por el volumen de producción, histórico del establecimiento, incumplimientos de la industria, posibilidades de contaminación cruzada entre líneas de elaboración y otros detalles que serán juzgados caso por caso por la autoridad competente.



En definitiva, se trata de una herramienta de apoyo y la valoración del riesgo de *Listeria monocytogenes* provendrá del análisis del riesgo concreto efectuado en ese establecimiento y para ese producto que podrá pertenecer a las Categorías 1.1, 1.2 y 1.3.

## **5. VERIFICACIÓN DEL MUESTREO DE ZONAS DE TRABAJO Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LA PRODUCCIÓN DE ALC PARA EL CONTROL DE LISTERIA MONOCYTOGENES**

### **5 a. VERIFICACIÓN DE LA TOMA DE MUESTRAS REALIZADAS POR EL OPERADOR DE LA EMPRESA ALIMENTARIA**

Se comprobará que la empresa dispone de un plan de muestreo que contemple la toma de muestras de zonas de trabajo y equipos utilizados en la producción de alimentos listos para el consumo para el análisis de *Listeria monocytogenes*. Se verificará que dicho plan identifica los puntos en los que se llevará a cabo el muestreo con unas frecuencias establecidas en base al riesgo, teniendo en cuenta las zonas poco accesibles, y que contempla medidas correctoras adecuadas para cuando se detecte la presencia de *L. monocytogenes* en estas muestras. Así mismo se revisará que el equipo de muestreo, la metodología, el transporte de las muestras y el inicio de los análisis son adecuados. También se comprobará que, en caso de resultado insatisfactorio en un producto o en caso de cambios en la estructura de la empresa o los equipos, esté previsto el refuerzo del plan de muestreo. Las muestras se tomarán de acuerdo con lo establecido en la guía de ANSES y se analizarán según el método analítico ISO 11290-1.

### **5 b. TOMA DE MUESTRAS OFICIAL**

De acuerdo con el artículo 9 del Reglamento 2017/625, las autoridades competentes podrán adaptar sus procedimientos de control oficial a estas directrices para realizar muestreos de superficies en empresas alimentarias que dispongan de líneas de producción de alimentos listos para el consumo que puedan plantear riesgo de *Listeria monocytogenes* y garantizarán que dichos controles se efectúan con regularidad, basados en el riesgo y con la frecuencia apropiada.

#### **5.1. Objetivo del muestreo**

Dependiendo del objetivo que se persiga, la toma de muestra se podrá realizar en un momento u otro:

##### **a) Verificación de una adecuada limpieza y desinfección**

Se llevará a cabo sobre las superficies limpias y desinfectadas y sin presencia de desinfectante residual, con neutralizador de desinfectante o habiendo transcurrido el tiempo necesario para que desaparezcan los residuos de desinfectante. El criterio de aceptabilidad debe ser siempre “ausencia” en la superficie muestreada, ya que no pueden darse por satisfactorias las superficies preparadas para su uso con presencia de *Listeria*.



El riesgo será muy diferente si se trata de una superficie de contacto directo o no, si la posible contaminación puede afectar a materia prima o bien a producto procesado, si la superficie contacta con un producto final o si el alimento se someterá posteriormente a un tratamiento post-letal y otras consideraciones para evaluar su probabilidad de ocurrencia. Se tratará de muestras pre-operativas.

#### b) **Detección del riesgo de contaminación directa de los alimentos**

El objetivo es valorar la posibilidad de contaminación por *Listeria* con la planta en funcionamiento y en superficies ya usadas o utilizándose, además de procurar la detección y eliminación de cepas persistentes o, en caso de que la eliminación no sea posible, el establecimiento de medidas correctivas orientadas a evitar la contaminación de los alimentos por estas bacterias. Se trataría fundamentalmente de superficies de contacto directo y son muestras operativas.

En los dos momentos en que se realice la toma de muestras –pre-operativo u operativo- es recomendable solicitar identificación de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* porque la detección de cualquier cepa no patógena de *Listeria* supone activar las medidas correctoras, ya que la aparición de contaminación por la especie patógena puede ser inminente al compartir los mismos nichos y tener similares características en cuanto a ecología microbiana. Estas dos determinaciones cualitativas, persiguen detectar la presencia del patógeno o del indicador y son mucho más apropiadas que realizar recuentos de *Listeria* en una superficie determinada. Los contajes dependiendo de la presencia de biofilms y con la sabida distribución irregular de la contaminación aportan resultados altamente variables. Las superficies a muestrear conviene que sean lo más amplias posible.

La autoridad competente, podrá decidir realizar una o ambas determinaciones, porque la reglamentación no habla más que de *Listeria monocytogenes* como especie patógena. No obstante, cabe indicar en este punto, que con la misma técnica analítica y un incremento de costes razonable pueden tener ambos resultados porque los primeros pasos del método son comunes si se utiliza la norma ISO 11290-1.

La presencia de biofilms supone un fallo continuado de limpieza, ya que indican que hay zonas que no se limpian, no se aplica el procedimiento correctamente o son zonas de difícil acceso al detergente y/o biocida. Estos fallos de limpieza deben corregirse y los biofilms eliminarse antes de realizar un muestreo para verificar la adecuada limpieza y desinfección. En ocasiones, los biofilms no se detectan fácilmente y, por ello, puede ser conveniente utilizar detectores de biofilms en superficies.

La elección de lugares de muestreo, equipos de muestreo, metodología de muestreo y transporte al laboratorio deben llevarse a cabo según la adjunta Guía de ANSES de directrices de muestreo de equipos y zonas de procesado de alimentos para la detección de *L. monocytogenes*. A continuación, se mencionan aspectos a destacar de la Guía e información adicional que puede resultar de utilidad.

### **5.2. Elección de lugares de muestreo**

Una vez definido el objetivo, habrá que realizar esta elección. En algunos establecimientos alimentarios están claras las zonas de exposición post-letal del producto y las que podrían



ser localizaciones prioritarias, sin descartar otras que puedan resultar de interés. Si no existe una etapa de letalidad, se abarcará todo el proceso de elaboración.

Es conveniente estudiarlo detenidamente y elegir las evaluando:

- El objetivo del muestreo.
- Los hallazgos que determinan el muestreo.
- Un estudio pormenorizado de los procesos que sufre el alimento y de los puntos de potencial contaminación sin descartar nada: equipos de contacto directo con el alimento, goteos de superficies que no están en contacto directo con el alimento, medioambiente y manipuladores.

Serán importantes los datos del histórico y las probabilidades de contaminación.

En estas áreas se debe distinguir:

- Zonas con elevada probabilidad de contaminación del producto o de contacto directo con el producto.
- Zonas con poca probabilidad de contaminación del producto o de contacto no directo, pero que pueden hacer llegar la contaminación por una ruta indirecta.

En cada una de estas zonas podrán seleccionarse los puntos de muestreo. Se recomienda disponer de un listado de puntos. A modo de ejemplos citamos algunos de los más habituales:

- Superficies que contactan con el alimento entre tratamiento térmico y envasado (zona de exposición post-letal)
- Superficies con presencia de condensación que puede llegar al producto.
- Cámaras frigoríficas: tiradores de apertura, estanterías, condensadores, rejilla de evaporadores...
- Encimeras en cuartos fríos.
- Abatidores de temperatura.
- Cintas transportadoras, carros de colgado, ganchos.
- Tablas de corte, zonas de apoyo del producto, mesas.
- Instrumentos de corte.
- Superficies entre mango y hoja de cuchillos u otros equipos cortantes.
- Cortafiambres, loncheadoras, batidoras, trituradoras.
- Picadoras, amasadoras, embutidoras, grapadoras, clipadoras.
- Recipientes, vagonetas, bañeras, envases.
- Pomos de puerta, guantes, delantales.

Aquellos que, a la vista de la inspección, se consideren fuentes potenciales.

### **5.3. Equipo de muestreo**

Se recomienda que permita la fricción fuerte de las superficies y el acceso, por su flexibilidad, a cualquier lugar. La necesidad de fricción la exigen los biofilms, en ocasiones muy consolidados y adheridos. Si no se puede frotar, se puede pasar por una zona de máxima contaminación sin detectarla. Por ello se recomienda la toallita humedecida con





agua de peptona y aplicada sobre las superficies con guantes estériles para evitar la contaminación de la muestra. La toallita permite acceder prácticamente a cualquier rincón y, en cuanto a la superficie de contacto, cuanto más se abarque, mejores resultados se obtendrán.

Otro equipo que ofrece flexibilidad y capacidad de fricción son las esponjas abrasivas que se usan normalmente en los mataderos para la determinación de *Salmonella*.

El hisopo no sería recomendable por su fragilidad, aunque puede reservarse a localizaciones en las que no es posible acceder mediante otros equipos de muestreo.

La autoridad competente optará por el mejor equipo de muestreo según las características de la zona a muestrear (zona amplia, grietas o zonas de difícil acceso, número de muestras a tomar...).

#### **5.4. Metodología de muestreo**

Se recomienda seguir la Guía ANSES y la ISO 18593. En concreto y con los equipos propuestos la metodología podría ser la siguiente:

- Utilización de una toallita húmeda que contacta totalmente por ambos lados (importante para duplicar la superficie de contacto) 10 veces en sentido horizontal y 10 veces en el vertical por cada uno de los lados.
- Después de tomar la muestra introducir la toalla en bolsa o frasco estéril, identificarlo y cambiar de guantes para la siguiente muestra.

Para favorecer la recuperación de las bacterias lesionadas o estresadas desde el mismo momento de la toma de muestras y, siempre que las capacidades logísticas nos lo permitan, se podrían emplear como diluyentes aquellos recogidos en el punto 6 del documento ANSES anexo. Este procedimiento de muestreo sería válido exclusivamente para la identificación o detección de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. y nunca para su recuento. En el caso de no utilizar esta técnica, se transportarán las toallitas humedecidas en el interior del frasco o bolsa estéril al laboratorio refrigeradas y en el menor tiempo posible. Estas consideraciones son igualmente válidas si se usa otro equipo de muestreo: esponja abrasiva, hisopo o rodillo.

- Si se utiliza la esponja abrasiva es conveniente que esté prehumedecida y el método será exactamente el mismo. Lo único que varía es que se trata de un equipo de muestreo menos flexible y con menor superficie de contacto que la toallita y como ventaja presenta mayor capacidad de fricción.
- Sobre el hisopo, su uso puede estar indicado en zonas no accesibles por otro método, pero su fragilidad limita la fricción y por su pequeño tamaño implica una menor superficie de contacto.
- Existen rodillos a los que se incorpora una camisa de gasa estéril que se desprende del equipo una vez tomada la muestra. Permiten presionar y friccionar constituyendo



otro buen método, aunque conlleva una mayor manipulación y por tanto posibilidades de contaminación no deseables.

## **5.5. Transporte al laboratorio y comienzo del análisis**

Las muestras se transportarán refrigeradas en un envase isoterma. El análisis de las muestras se realizará lo más rápido posible y nunca deben transcurrir más de 24-36 h. desde la toma de la misma. La hora de la toma de muestras se refleja en el acta de toma de muestras y en la ficha del laboratorio aparecerán tanto la hora de recepción como la del comienzo del análisis.

Los análisis para la investigación de *Listeria monocytogenes* se realizarán de acuerdo a la Norma ISO 11290-1 o métodos que hayan sido convenientemente validados frente a ella, de acuerdo al artículo 5 del Reglamento (CE) N<sup>o</sup> 2073/2005. Los laboratorios asignados por las autoridades competentes para llevar a cabo el control oficial estarán acreditados para esta determinación conforme a la Norma ISO 17025.

El preenriquecimiento selectivo en caldo Fraser a media concentración facilita el crecimiento y también recuperar bacterias dañadas como señala la ISO 11290-1 y es considerado una etapa básica en el método analítico de detección de *Listeria monocytogenes*. En el ámbito de la exportación algunos países rechazan para los análisis que deben servir de garantía en los productos a exportar, métodos rápidos que no lo incluyan. En el caso de emplear métodos de screening que requieran confirmación por otro ensayo, es importante tener en cuenta que el caldo de enriquecimiento primario sea el mismo para ambos métodos.

## **6. ACTUACIONES DE CONTROL OFICIAL ANTE DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN SUPERFICIES DE TRABAJO Y EQUIPOS**

### **6 a. DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES EN LA TOMA DE MUESTRAS REALIZADA POR EL OPERADOR DE LA EMPRESA ALIMENTARIA**

Se verificará que la empresa lleva a cabo las medidas correctoras que tiene establecidas ante la presencia de *L. monocytogenes* en sus muestras de superficies y que además comprueba la eficacia de estas medidas.

La autoridad competente, al verificar la aplicación de estas medidas, valorará si la seguridad alimentaria del producto está garantizada.

Si, a su juicio, las medidas adoptadas por el operador no garantizan la seguridad del producto, o se constata que el operador no ha tomado las medidas contempladas en su sistema de autocontrol, podrá tomar otras medidas, que podrán incluir la rigurosa identificación del producto afectado, la retención voluntaria, la inmovilización cautelar y la toma de muestras oficial del producto sospechoso de estar contaminado.

La toma de muestras será reglamentaria y se basará en el/ los ALC más relacionados con la superficie o equipo donde se haya encontrado la presencia de *L. monocytogenes*, para su determinación. Si algún producto incumple el criterio de *L. monocytogenes* especificado en el Reglamento CE N<sup>o</sup> 2073/2005, se actuará de acuerdo a lo establecido en el punto 7 de este documento.



## 6 b. DETECCIÓN DE L. MONOCYTOGENES EN LA TOMA DE MUESTRAS OFICIAL

- **Notificación del resultado y requerimiento de un Plan de actuación al operador de la empresa alimentaria**

La autoridad competente requerirá al operador de la industria alimentaria que investigue la causa de la contaminación y garantice el cumplimiento de los criterios microbiológicos en el producto. Serán necesarias medidas correctoras para evitar la repetición de la no conformidad. El operador, en caso de desacuerdo con los resultados del muestreo oficial, tendrá siempre derecho, y así se le hará saber, a un segundo examen pericial según establece el R. (UE) 2017/625.

Los pequeños establecimientos que produzcan ALC cuyo análisis de peligros haya determinado que son susceptibles de plantear un riesgo de *Listeria monocytogenes* deberán contemplar medidas de control para este riesgo y, en el caso de que tengan que tomarlas ante alguna no conformidad, registrarlas. Este requerimiento es básico y no compromete el objetivo de simplificación que persiguen las Guías de Buenas Prácticas bajo las que garantizan la seguridad alimentaria de sus productos.

Las medidas que aplique el operador se tienen que basar en evidencias y en los resultados de la investigación de las causas para poder ser objetivas, eficaces y proporcionadas. El operador contemplará en su sistema de gestión de la seguridad alimentaria, las medidas a tomar en función de si el resultado insatisfactorio corresponde a una superficie de contacto posterior al tratamiento letal o no.

En el caso de que los tratamientos y/o procesos que reciba el producto para garantizar su seguridad alimentaria sean subletales – curado, salazón, acidificación, nitrificación etc. – y estén controlados mediante un punto de control o un PCC, las medidas a tomar serán las que tenga previstas para esas desviaciones y se adecuarán, con carácter general, a los puntos siguientes y, en particular, con las medidas específicas resultantes del estudio de causas.

- **Estudio de causas de la contaminación**

Tiene carácter previo y el operador, para realizar su plan de actuación, se habrá basado en su estudio de causas teniendo en cuenta los resultados históricos de superficies muestreadas y de los distintos registros obrantes en su autocontrol, que entre otros pueden ser:

- Registros de producción del lote/s concernidos, particularmente si existen puntos de control críticos (PCCs) en tratamientos térmicos u de otro tipo.
- Registros de verificación de la última limpieza y desinfección efectuada.
- Registros de los Preoperativos y Operativos realizados. Se revisarán los registros de su Plan de Limpieza y Desinfección, o en su caso, del Programa Normalizado de Control de la Higiene.
- Registro de Incidencias.
- Entrevistas con el personal que ha participado en la limpieza y el procesado. También con el encargado de planta.



- **Detección de *L. monocytogenes* en superficie de contacto con productos alimenticios posterior al tratamiento letal y en superficies de contacto con alimentos procesados sin etapa de letalidad**

Ante un resultado insatisfactorio de *Listeria* en superficie de contacto con producto posterior al tratamiento letal o en superficies de contacto con productos procesados sin etapa de letalidad, el operador, entre otras medidas que considere necesario incluir en su plan de actuación, deberá mostrar:

- Evidencias de la parada del equipo afectado, línea de producción o instalación tras el positivo.
- Identificar lotes de productos elaborados/envasados/reenvasados en el equipo, línea de producción o instalación desde la toma de muestra hasta la inmovilización efectiva.
- Evidencias de la verificación analítica de dichos lotes con un muestreo representativo en función de la cantidad y tipología de productos fabricados/envasados/reenvasados. Para juzgar la representatividad podrán utilizarse los criterios de la UNE-EN-ISO 2859 en sus partes 1,2 y10.
- Evidencias de la adopción de medidas extraordinarias de Limpieza y Desinfección de los equipos y de la línea de producción.
- Evidencias de análisis negativo en superficies de contacto antes de la reanudación de la actividad.
- Evidencias de refuerzo temporal de los muestreos de verificación en producto, superficie de contacto y ambientales.

- **Detección de *L. monocytogenes* en superficie de contacto previa al tratamiento letal del producto alimenticio o en superficie sin contacto con alimento.**

Ante un resultado insatisfactorio en superficie de contacto previa al tratamiento letal, o en otras superficies sin contacto directo con alimentos (ambientales), el operador, entre otras medidas que considere necesario incluir en su plan de actuación, deberá mostrar:

- Evidencias de la adopción de medidas extraordinarias de L+D de equipos y líneas de producción.
- Evidencias del refuerzo temporal de muestreos de verificación en productos y superficies.
- Comprobaciones los registros de verificación de la última L+D efectuada

## **7. ACTUACIONES DE CONTROL OFICIAL ANTE DETECCIÓN DE LISTERIA MONOCYTOGENES EN EL PRODUCTO.**

Si el análisis del producto confirma la contaminación y el incumplimiento del criterio de seguridad alimentaria del Reglamento (CE) N° 2073/2005 respecto a *Listeria monocytogenes*, el operador tendrá que aplicar lo dispuesto en el artículo 7 del Reglamento sobre "Resultados insatisfactorios".

Entre las acciones a llevar a cabo por el operador y que deberán estar recogidas en su sistema de gestión de la seguridad alimentaria se encontrarían las siguientes:



- Identificación del producto contaminado.
- Retirada de la comercialización del producto contaminado.
- Estudio de causas.
- Puesta en marcha de acciones correctoras.
- Restablecimiento de las condiciones adecuadas para garantizar la seguridad del producto.

Un aspecto importante habrá sido la determinación del producto que puede estar afectado por la contaminación en zonas y equipos. El criterio estará establecido en el procedimiento de autocontrol del operador y, en su ausencia, se puede considerar contaminado el producto elaborado desde la última limpieza y desinfección que según constancia registral se considere bien aplicada y, a ser posible, verificada.

En todos los casos, en las acciones correctoras se habrá procedido a la aplicación de un plan de limpieza y desinfección de choque frente a *Listeria* que aporte garantías de la eliminación de la contaminación. Este plan debe estar ya previsto en las industrias de riesgo, contemplando los procedimientos de limpieza y biocidas activos frente a *Listeria monocytogenes*. Estas actuaciones específicas deben terminar con verificación analítica satisfactoria por parte del operador económico (ausencia de *Listeria* en las superficies que habían resultado positivas).

Las decisiones tienen que estar suficientemente avaladas y disponer de evidencias objetivas, como son los boletines analíticos.

### **7.1. Posibles destinos del producto**

En cuanto al destino del producto contaminado, se pueden contemplar las siguientes posibilidades:

- **Reprocesado:** Se podrá realizar únicamente en el caso de que el producto se encuentre aún en el propio establecimiento alimentario, o en productos comercializados que todavía no estén a nivel de comercio al por menor, ya que no es posible aplicarlo en alimentos ya distribuidos al comercio minorista\*

Estos reprocesos deben estar previstos en el autocontrol y justificados técnicamente, pudiendo aplicar un nuevo tratamiento letal o que el alimento adquiera unas características físico-químicas que eliminen el riesgo de *Listeria*. La empresa debe presentar evidencias de que el producto cumple el criterio de seguridad alimentaria correspondiente, de acuerdo con la legislación europea.

Las autoridades competentes, en el marco de los controles oficiales efectuados sobre los establecimientos, valorarán la idoneidad de estos procedimientos conforme a lo establecido en el artículo 7 del Reglamento.

Además, la empresa tendrá que presentar evidencias de que adopta medidas para que, durante las operaciones de reprocesado, no se vuelvan a contaminar las instalaciones.



\* **Artículo 7 Resultados insatisfactorios**

*“...2. Cuando las pruebas efectuadas para comprobar el cumplimiento de los criterios establecidos en el anexo I, capítulo 1, den resultados insatisfactorios, el producto o lote de productos alimenticios será retirado o recuperado conforme a lo dispuesto en el artículo 19 del Reglamento (CE) Nº 178/2002. No obstante, los productos comercializados que todavía no se hallen a nivel de comercio al por menor y que no cumplan los criterios de seguridad alimentaria podrán ser sometidos a una transformación ulterior mediante un tratamiento que elimine el riesgo en cuestión. Dicho tratamiento sólo podrán realizarlo explotadores de empresas alimentarias que no sean vendedores al por menor. El explotador de empresa alimentaria podrá utilizar el lote para fines distintos a los previstos originalmente, siempre que este uso no plantee un riesgo para la salud pública o la salud animal y el uso se haya decidido dentro de los procedimientos basados en los principios HACCP y en las prácticas de higiene correctas y esté autorizado por la autoridad competente.”*

**-Clasificación como SANDACH:** El responsable de la industria alimentaria deberá categorizar el producto afectado como subproducto de origen animal no destinado al consumo humano y gestionarlo según la normativa en vigor.

**-Gestión conforme a normativa de residuos** para aquellos productos que no sean de origen animal.

## **7.2. Evaluación del control oficial**

La autoridad competente podrá evaluar la eficacia de las medidas correctoras aplicadas por el operador económico incluyendo los cambios realizados en su sistema APPCC para evitar la reincidencia, mediante nuevos muestreos oficiales, así como juzgar **la idoneidad de la frecuencia y número de muestreos de superficies y productos en su procedimiento autocontrol en base a los resultados obtenidos.**

**Esta nota, que debe ser entendida en su integridad y nunca de modo parcial, cumple una función meramente informativa, careciendo, por tanto, en el plano jurídico, de valor vinculante alguno.**

## ANEXO

# Directrices sobre el muestreo de equipos y zonas de procesamiento de alimentos para la detección de *Listeria monocytogenes*

Versión 3 – 20/08/2012

**Nota: este texto se trata de una traducción oficiosa, siendo exclusivamente un instrumento de documentación. La versión auténtica es la disponible en inglés.**

Brigitte CARPENTIER y Léna BARRE,  
LRUE para la *Listeria monocytogenes*,  
Laboratorio de Seguridad Alimentaria de  
MaisonsAlfort, ANSES, Francia

En colaboración en:

S. Barbuti	SSICA	Italia
J. Canet Noguera	FECIC	España
H. da Silva Mateus Fernandes Guedes	INRB / LINIA / UITA (NRL <i>Lm</i> )	Portugal
C. Dufour	SILLIKER SAS	Francia
A. Español Pueyo	Laboratorio de Salud Pública de Huesca	España
A. L. Ferreira Tavares	Laboratório Tomaz	Portugal
L. Gram	Danish Technical University	Dinamarca
T. Grégori	FICT	Francia
B. Hickey	Dairy Science Laboratory (NRL <i>Lm</i> )	Irlanda
J. Lago	ANFACO-CECOPECA	España
P. Leglise	Laboratoire Départemental de la Côte d'Or	Francia
A. S. Orfão Ferraz	Globalab-Ensaios Químicos e Microbiológicos S.A.	Portugal
J. Pardos Bosch	Laboratori de l'Agència de Protecció de la Salut del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya	España
C. M. Pires Gomes	INRB / LINIA / UITA (NRL <i>Lm</i> )	Portugal
N. Sanchez	SOREDAB	Francia
J. Sanchez Hernandez	Laboratorio de Salud Pública de Salamanca	España
M. Sol	INRB-LINIA-UITA (NRL <i>Lm</i> )	Portugal
V. Stahl	Aérial Technical Institute for Food Industry	Francia
M. M. Tenreiro dos Santos Monteiro Saraiva	National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge	Portugal
J. Toomas Kramarenko	Veterinary and Food Laboratory (NRL <i>Lm</i> )	Estonia

## ÍNDICE

- 1 Sumario
- Prefacio
- Introducción
- 2 Ámbito de aplicación
- 3 Referencias normativas
- 4 Selección de los puntos de muestreo
- 5 Momento en el que debe llevarse a cabo el muestreo
- 6 Diluyentes empleados para humedecer los dispositivos de muestreo por frotado
  - 6.1 Diluyentes simples
  - 6.2 Diluyentes neutralizadores
- 7 Medios de cultivo
- 8 Aparatos y utensilios de vidrio
- 9 Zonas en las que debe llevarse a cabo el muestreo
- 10 Preparación de los dispositivos de muestreo
  - 10.1 Hisopos
  - 10.2 Esponjas, paños (tejidos y sin tejer) y gasas
- 11 Muestreo
  - 11.1 Hisopos
  - 11.2 Esponjas, paños o gasas
- 12 Transporte, almacenamiento e inicio del análisis de las muestras
- 13 Análisis de las muestras
  - 13.1 Hisopos
  - 13.2 Esponjas, paños y gasas.
- 14 Expresión de los resultados
- 15 Referencias





## 1. SUMARIO

### PREFACIO

Tras una revisión de la literatura llevada a cabo por el Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para la *Listeria monocytogenes* (LRUE Lm), el LRUE Lm y la red de Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) acordaron que la Norma Internacional ISO 18593, por la que se describen métodos de muestreo de superficies para la detección y el recuento de bacterias en equipos y zonas de procesado de alimentos, no aporta las directrices suficientes específicas para la detección de *L. monocytogenes* (véase también la introducción). Como consecuencia, se acordó que el LRUE Lm redactaría un documento guía en relación con este tema, en colaboración con un grupo de trabajo (GT). Este GT estaba formado por 20 miembros de 7 Estados miembros (EM) de la UE pertenecientes a 3 LNR y otras organizaciones (véase primera página).

Además de la revisión de la literatura y las contribuciones de los miembros del GT, estas directrices también se basan en un sondeo llevado a cabo en 2010 sobre las prácticas de muestreo de superficies (137 entrevistados de 15 EM de la UE, pertenecientes a empresas alimentarias, proveedores de servicios de control de higiene, servicios de control oficiales...), que reveló la existencia de una gran variedad de prácticas y de algunas prácticas inadecuadas así como la necesidad de un documento europeo.

Se prepararon varios borradores del documento, que fueron sometidos a consulta de todos los LNR, en una primera etapa, que a su vez consultaron a los operadores nacionales que practicaban el muestro de superficies y, posteriormente, de los miembros del GT.

La versión actual (versión 3) es el resultado del acuerdo de todos los LNR alcanzado en el taller anual que se celebró entre el 28 y el 30 de marzo de 2012 y recoge los comentarios recibidos de 3 EM de la UE (UK, NL y DE) en el marco de una consulta a los EM realizada por la DG SANCO. Esta versión fue acordada por el Comité Permanente de la Cadena Alimentaria y de Sanidad Animal de los EM de la UE en su reunión del 18 de julio de 2012 a través de una consulta por escrito de 2 semanas de duración.

## INTRODUCCIÓN

Hoy día, se sabe con certeza que los alimentos listos para el consumo pueden contaminarse durante su transformación por subtipos de *Listeria monocytogenes* que persisten en las plantas procesadoras [1]. Por lo tanto, en virtud del Reglamento (CE) n.º 2073/2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, es necesario y preceptivo llevar a cabo muestreos rutinarios de los equipos y zonas de procesado para la detección de la *L. monocytogenes* en función de un protocolo de muestreo [2]. Este tipo de protocolo de muestreo tiene como objetivo la detección y erradicación de una cepa persistente o, en caso de que su erradicación no sea posible, la ejecución de medidas correctivas orientadas a evitar la contaminación de los alimentos por bacterias patógenas. Sobre este tema, se encuentran publicados varios documentos guías [3-5]. Cabe tener en cuenta que un programa o unas técnicas de muestreo ineficaces pueden conllevar que no se detecte la presencia de *L. monocytogenes* cuando sea necesario y provocará que no se tomen medidas correctivas, además de dar una falsa sensación de seguridad.

La Norma Internacional ISO 18593 [6], por la que se describen métodos de muestreo de superficies para la detección y el recuento de microorganismos viables, no aporta directrices suficientes ni recomendaciones específicas para la detección de *L. monocytogenes*. En el caso de la *L. monocytogenes*, los métodos de muestreo mediante frotado (hisopos y esponjas/técnica del paño) son los únicos que se consideran adecuados. La norma ISO no precisa el momento en el que el muestreo debe llevarse a cabo o cuáles son las zonas de las que hay que tomar muestras. El propósito de estas directrices es compensar este vacío a la hora de implementar el Artículo 5.2 del Reglamento (CE) n.º 2073/2005 [2]. Asimismo, se determinó que no abordaba la forma en la que efectuar el recuento de *L. monocytogenes* presente en las superficies por los motivos que se exponen a continuación. En primer lugar, con los utensilios de frotado, la proporción de células bacterianas que se adhieren es desconocida y variable. En segundo lugar, las células de *L. monocytogenes* no se distribuyen de forma uniforme por las superficies, por lo que las comparaciones de los resultados de grandes y pequeñas zonas no serían válidas.



Tras el muestreo, el análisis de las muestras se efectuará de conformidad con la norma EN ISO 11290-1 u otros métodos validados alternativos, en virtud del Artículo 5 del Reglamento (CE) n.º 2073/2005<sup>1</sup>.

En caso de que se detecten muestras con un resultado positivo “excesivo” para la *L. monocytogenes* (véase apartado 5) en sucesivas campañas de muestreo en una misma planta procesadora en la que ya se han tomado medidas preventivas, será necesario realizar la subtipificación de las cepas aisladas de *L. monocytogenes* mediante un método molecular (por ejemplo, electroforesis en gel de campo pulsado, análisis en múltiples loci mediante repeticiones en tándem de número variable o análisis mediante fluorescencia de los polimorfismos de la longitud del fragmento amplificado) a fin de determinar si las cepas aisladas pertenecen a un único tipo y, por tanto, es persistente.

## 2 ÁMBITO DE APLICACIÓN

Estas directrices especifican el lugar, la forma y el momento en el que se deben tomar muestras mediante frotado para la detección de *L. monocytogenes* en las superficies de los equipos y zonas de procesado de alimentos listos para el consumo.

NOTA 1: Las superficies de los equipos y zonas de procesado no son el único lugar que se debe supervisar. El protocolo de muestreo deberá incluir también los coadyuvantes tecnológicos (aire comprimido, hielo, salmuera, agua, agua de drenaje, etc.), cuyas técnicas de muestreo no se recogen en el presente documento.

NOTA 2: En este documento, no se ofrecen recomendaciones con respecto a la frecuencia de muestro, el número de puntos de muestreo, la validez de la composición (mezcla) de las muestras o la necesidad de rotar los puntos de muestreo, debido a que estas cuestiones deben decidirse caso por caso con un enfoque basado en los riesgos.

NOTA 3: Estas directrices no han sido diseñadas para evaluar la eficacia de los procesos de limpieza y desinfección.

---

<sup>1</sup> Conforme a lo establecido en el Reglamento (CE) n.º 2073/2005, el presente documento versa únicamente sobre la detección de *L. monocytogenes*. A este respecto, cabe mencionar que, tal y como sugiere que el Codex Alimentarius [3], los programas de control eficaces también se pueden realizar análisis de *Listeria* spp., ya que su presencia es un buen indicador de las condiciones que favorecen la posible presencia de *Listeria monocytogenes*.



### 3 REFERENCIAS NORMATIVAS

A la hora de aplicar este documento, se recomienda consultar las siguientes normas:

ISO 6887-1: Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Preparación de las muestras de ensayo, suspensión inicial y diluciones decimales para examen microbiológico. Parte 1: Reglas generales para la preparación de la suspensión inicial y las diluciones decimales

ISO 7218: Microbiología de los alimentos para consumo humano y alimentación animal. Requisitos generales y guía para el examen microbiológico

ISO 11290-1: Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección

ISO/TS 11133: Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Guía para la preparación y producción de medios de cultivo

### 4 SELECCIÓN DE LOS PUNTOS DE MUESTREO

La *L. monocytogenes* puede estar presente en superficies limpias a simple vista, aunque es más frecuente en lugares húmedos y sucios, que permiten el crecimiento y la persistencia de la bacteria [1, 7].

Aquellos lugares de difícil acceso, como pueden ser orificios o grietas en equipos hechos con materiales fibrosos, porosos, oxidados o huecos que no pueden limpiarse fácilmente son potenciales lugares donde puede albergarse la bacteria y de donde deben tomarse muestras.

Puede resultar difícil tomar muestras de zonas inaccesibles, en las que se acumulan restos de alimentos. Para ello, las muestras se deberán tomar tras desmontar los equipos junto con los profesionales de mantenimiento. En estas zonas, no se recomienda tomar muestras mediante enjuagado, ya que esta técnica no es tan eficaz como el frotado a la hora de adherir los microorganismos presentes en las superficies.

Se deben recoger muestras con frecuencia de zonas en las que los productos alimenticios están expuestos a contaminación, aunque puede resultar interesante tomarlas también, con menor frecuencia, de aquellas en las que no están expuestos (zonas de almacenamiento).

La selección del punto de muestreo debe basarse en el historial de cada fábrica tras la revisión del proceso paso a paso. A continuación se relacionan de forma somera los lugares de los puntos de muestreo que deben ser seleccionados [4, 5, 8]:

- Superficies que no se encuentran en contacto con alimentos: desagües; suelo; acumulaciones de agua del suelo; instrumentos de limpieza; zonas de lavado; equipos de peso de suelo; tubos; rodillos huecos de cintas transportadoras; transportadores; estructuras de equipos; paneles de control internos de equipos; bandejas colectoras de condensado; carretillas elevadoras; carretillas manuales; trolleys; ruedas de trolleys; cubos de basura; congeladores; máquinas de hielo; aletas de refrigeración de condensadores; delantales; paredes; techos; puntos fríos de condensación de agua, como los aislantes de humedad que se encuentran en el interior de paredes o alrededor de tuberías y unidades de refrigeración; sellado de goma alrededor de puertas, especialmente de refrigeradores; contenido de aspiradoras; mangos de puertas y grifos.
- Superficies en contacto con alimentos: cintas transportadoras, cortadoras, tablas de cortar, picadoras, tolvas, ralladores, licuadoras, peladores, empacadoras, equipos de envasado y embotellado, envases, otros utensilios y guantes no desechables.

## 5 MOMENTO EN EL QUE DEBE LLEVARSE A CABO EL MUESTREO

La detección de *L. monocytogenes* puede dificultarse si se toman las muestras inmediatamente o poco después de que se haya producido la limpieza y desinfección. Debido a los daños que los agentes químicos utilizados para la limpieza y desinfección producen en las células, estas pueden continuar con vida, aunque no sean cultivables, por lo que no se detectan fácilmente [8]. Además, es posible que no se puedan detectar aquellas células que hayan quedado albergadas en ciertos lugares, a pesar de su limpieza y desinfección. Es más fácil tomar muestras una vez que son desalojadas durante el procesado de los alimentos debido a la vibración de los equipos y/o tras el contacto con alimentos y líquidos [9].

Por lo tanto, para aumentar la probabilidad de detección de una cepa persistente, las muestras se deberán tomar durante el procesado de los alimentos, una vez transcurridas dos horas como mínimo tras la producción o al final de esta fase, es decir, antes de los procesos de limpieza y desinfección [4, 8-11].

En las líneas de transformación en las que se fabrican productos alimenticios a partir de productos crudos que no han sido sometidos a ningún tratamiento que reduzca los niveles de microorganismos (por ejemplo, quesos crudos), las muestras de las superficies para la detección de *L. monocytogenes* que se tomen durante la fase de transformación pueden proceder tanto de estos productos crudos como de los lugares en los que las células de *L. monocytogenes* pueden persistir en el entorno de procesado del alimento. Cuando en las plantas se procesan productos pasteurizados o materias primas que normalmente no están contaminadas (por ejemplo, quesos pasteurizados), en el análisis de *L. monocytogenes* de una muestra superficial esta debería considerarse como un tipo persistente de *Listeria*.

Cuando los alimentos llegan a las instalaciones de procesado en estado crudo o tras haber sido sometidos a un tratamiento para la disminución de la carga microbiana (pasteurización, microfiltración etc.)<sup>1</sup>, las empresas alimentarias deberían, dentro de su plan de APPCC, definir un número aceptable de muestras positivas, que puede ser diferente para la detección de *L. monocytogenes* en aquellas superficies que se encuentran en contacto con alimentos de las que no. Cuando se supere el número establecido de muestras positivas, se deberán tomar medidas correctivas en función del plan de APPCC de la empresa alimentaria<sup>2</sup>.

Es evidente que, cuando se procesa un alimento crudo, se pueden tomar muestras tras los procesos de limpieza y desinfección o al inicio de la fase de producción, además de las muestras que se recojan durante su transformación. No obstante, este procedimiento puede dar una falsa sensación de seguridad. Por el contrario, la detección de *L. monocytogenes* en superficies en contacto con alimentos tras los procesos de limpieza y desinfección es un indicador de la existencia de un fallo grave en tales procesos.

En el caso de que no se tomen muestras a diario, no se recomienda que el muestreo tenga lugar siempre el mismo día(s) de la semana. Asimismo, sería recomendable tomar muestras cuando se efectúen tareas de mantenimiento o reparación de equipos, se realicen obras y aumente la producción, ya que son situaciones que pueden aumentar el riesgo de contaminación con *L. monocytogenes*.

<sup>1</sup> Tanto los alimentos como los ingredientes deberán analizarse en función del plan de APPCC.

<sup>2</sup> El número aceptable de muestras positivas podría ser cero cuando los alimentos que entran en las instalaciones de procesado han sido sometidos a tratamientos destinados a disminuir la carga microbiana.



## 6 DILUYENTES EMPLEADOS PARA HUMEDECER LOS DISPOSITIVOS DE MUESTREO POR FROTADO

### 6.1 DILUYENTES SIMPLES

En aquellas zonas de fácil acceso de las que se tomen muestras durante o al final de la fase de transformación, se deberán utilizar diluyentes simples que no contengan neutralizadores para humedecer los hisopos u otros utensilios de muestreo por frotado.

Se recomiendan los siguientes diluyentes: solución de peptona en una concentración de 1 g/l, solución de peptona salina o solución Ringer's ¼, distribuidas en tubos o botes y esterilizadas durante 15 min a 121 °C.

No se recomienda utilizar diluyentes tamponados de fosfato en caso de células estresadas por las condiciones hostiles de las instalaciones de procesado de alimentos (sal, ácidos, productos de limpieza y desinfección, etc.) debido a que pueden perjudicar su cultivabilidad [12].

Asimismo, tampoco se recomienda utilizar diluyentes neutralizadores cuando no se espera la presencia de residuos de desinfectantes. Los neutralizadores que se emplean para eliminar residuos de desinfectantes pueden tener leves consecuencias negativas para las células bacterianas y es posible que estas consecuencias sean mayores cuando las células están estresadas. De hecho, se ha demostrado que los neutralizadores reducen las tasas de cepas de *Salmonella* en las muestras de campo [13].

Por otra parte, se desaconseja utilizar un caldo Fraser (completo o semi) como sustitutivo de un diluyente dado que podría favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* en la planta de procesado.

### 6.2 DILUYENTES NEUTRALIZADORES

En las zonas en las que se espere encontrar residuos de desinfectantes o en el caso de que se tomen muestras inmediatamente después del proceso de desinfección, se deberán utilizar diluyentes neutralizadores para humedecer los hisopos u otros utensilios de muestreo por frotado.

Cuando se emplee cloro o compuestos que liberen cloro, se deberá utilizar tiosulfato de sodio como neutralizador. En el caso de otras sustancias activas, existen distintos neutralizadores (véase EN 1276 [14], EN 1650 [15], EN 13697 [16] y EN 13704 [17]), aunque ninguno de ellos es adecuado para todos los desinfectantes ("universal") [18]. En la Tabla 1, se

describe un diluyente neutralizante que puede utilizarse en la mayoría de los casos. Debe distribuirse en tubos o botes y ser esterilizado durante 15 min a 121 °C.

**Tabla 1. Diluyente neutralizador que puede ser empleado en la mayoría de los casos (adaptación de ISO 18593 [6])**

Componente	Conc.
Monooleato de sorbitán (Polisorbato 80)	30 g/l
Lecitina	3 g/l
Tiosulfato de sodio	5 g/l
L-histidina	1 g/l
Saponina	30 g/l
Peptona	1 g/l
Cloruro de sodio	8,5 g/l

## 7 MEDIOS DE CULTIVO

Véase la norma EN ISO 11290-1 sobre los medios de cultivo.

## 8 APARATOS Y UTENSILIOS DE VIDRIO

En la norma EN ISO 7218, se pueden consultar los requisitos generales.

Los requisitos específicos para la *L. monocytogenes* se pueden consultar en la norma EN ISO 11290-1 y sus modificaciones. Se recomienda utilizar los aparatos de laboratorio habituales en microbiología y, en concreto, los que se mencionan a continuación.

### 8.1. Dispositivos de muestreo de frotado

**Hisopo:** bastoncillo esterilizado que acaba en una punta de algodón o de material sintético contenido individualmente en un tubo esterilizado. Deberá estar documentado el hecho de que el material empleado no contenga sustancias inhibidoras.



NOTA: En algunos tipos de superficies, los residuos de algodón pueden contaminar las partes internas de estas superficies tras el muestreo.

***Espanja, paños (tejidos y sin tejer) y gasas:*** son esterilizados y envasados individualmente en bolsas de plástico esterilizadas. Deberá estar documentado el hecho de que el material empleado no contenga sustancias inhibidoras.

- 8.2. Guantes desechables esterilizados (opcional)**
- 8.3. Caja térmica con bolsas de hielo y aislamiento, con capacidad para mantener las muestras a una temperatura de entre 1 y 8 ° C durante su transporte al laboratorio (véase EN ISO 7218)**
- 8.4. Papel absorbente esterilizado, utilizado para absorber agua estancada (charcos de agua en el suelo)**
- 8.5. Agitador, utilizado para mezclar los líquidos que se encuentran contenidos en tubos**
- 8.6. Homogeneizador peristáltico, utilizado para preparar las suspensiones iniciales mediante movimientos peristálticos**

## **9 ZONAS EN LAS QUE DEBE LLEVARSE A CABO EL MUESTREO**

La superficie total de la zona muestreada durante una campaña de muestreo debe ser lo más amplia posible a fin de aumentar las probabilidades de detección de *L. monocytogenes*. En este sentido, se recomienda tomar muestras de una superficie de entre 1000 cm<sup>2</sup> y 3000 cm<sup>2</sup> (es decir, de 0,1 m<sup>2</sup> a 0,3 m<sup>2</sup>) siempre que sea posible [6, 10, 11], esto es, cuando las zonas sean abiertas y planas (transportadores, cajones, etc.).

Para aquellas zonas pequeñas de difícil acceso, se recomienda utilizar hisopos (por ejemplo, dentro de los rodillos huecos, la carcasa del motor, etc.).

Por el contrario, se recomienda utilizar esponjas, paños (tejidos o no) o gasas para tomar muestras de las zonas más amplias. No obstante, los hisopos permiten frotar las superficies con más fuerza y son más absorbentes. Por otra parte, se desaconseja utilizar plantillas o reglas



milimetradas, ya que pueden transferir la contaminación y/o su desinfección puede interferir en el análisis. Aun así, se debe conocer la extensión aproximada de la zona muestreada. Para ello, el operador debe recordar que la longitud del antebrazo, desde la punta del dedo corazón hasta el codo (un codo), es de aproximadamente 45 cm.

Asimismo, cuando los dedos se encuentran extendidos, la distancia entre la punta del pulgar y la del meñique (un palmo) es de aproximadamente 20 cm. Las extensiones de las zonas muestreadas deberán ser constantes para que puedan ser supervisadas en el futuro.

## 10 PREPARACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS DE MUESTREO

Ningún equipo que haya estado presente en un laboratorio microbiológico debe ser introducido en una zona de producción de alimentos, ya que existe el riesgo de introducir también contaminación.

Los equipos de muestreo de superficies así como las telas protectoras deben ser almacenados y manipulados por separado de las operaciones de laboratorio, especialmente de aquellas instalaciones del laboratorio en las que se analizan sustancias patógenas.

Las empresas deberán garantizar que ningún utensilio que se haya utilizado en el muestreo se quede en la zona de producción. Para ello, se recomienda contar estos utensilios antes y después de la recogida de muestras.

### 10.1 HISOPOS

Los hisopos pueden utilizarse húmedos o en seco. En el supuesto de que la zona de muestreo sea húmeda, se deberá utilizar un hisopo seco, mientras que en el caso de que la zona de muestreo sea seca, se deberá utilizar un hisopo húmedo. En el caso de que el muestreo tenga lugar en una zona, ya sea húmeda o seca, en la que se esperan encontrar residuos de desinfectantes (lo que es frecuente en zonas de difícil acceso), debe humedecerse el hisopo con un diluyente neutralizador (6.2).

Los hisopos húmedos pueden ser preparados en condiciones asépticas en el laboratorio antes de llevar a cabo la campaña de muestreo. El extremo del hisopo deberá entrar en contacto ligeramente con la superficie del diluyente (6.1 o 6.2) para evitar que gotee [8]. Posteriormente, el hisopo será devuelto al tubo, que se deberá cerrar con fuerza para mantener tanto la esterilidad como la humedad.



## 10.2 ESPONJAS, PAÑOS (TEJIDOS Y SIN TEJER) Y GASAS

Antes de iniciar la toma de muestras, los dispositivos de frotado húmedos pueden ser preparados en el laboratorio mediante la adición del volumen adecuado, que quedará registrado, de diluyente esterilizado (6.1 o 6.2) para evitar que gotee. Después de humedecer el dispositivo de frotado, se deberá cerrar la bolsa de plástico de forma que se garantice su esterilidad y se mantenga la humedad.

En caso de que los dispositivos de muestreo sean humedecidos en la zona de procesado, el diluyente no deberá almacenarse en un bote de vidrio.

## 11 MUESTREO

### 11.1 MÉTODO DE EMPLEO DE HISOPOS

Extraer un hisopo del tubo en el que se encuentra y frotar con la máxima fuerza posible sin desintegrarlo y rotarlo en el interior del equipo o sobre cualquier otra zona de difícil acceso de la que se vayan a tomar muestras.

Colocar el hisopo en el tubo original, cerrar el tubo para proteger el hisopo de cualquier tipo de contaminación y para que su extremo permanezca húmedo hasta el momento del análisis.

Tras la recogida de muestras, frotar sobre la zona muestreada un paño con alcohol.

### 11.2 MÉTODO DE EMPLEO DE ESPONJAS, PAÑOS O GASAS

En el caso de que la zona de la que se van a tomar muestras tengan excesiva humedad (por ejemplo, en los charcos de agua del suelo), en primer lugar, retirar con suavidad el exceso de líquido con un papel absorbente esterilizado.

Abrir la bolsa de plástico que contiene el dispositivo de frotado. Extraer de forma aséptica el dispositivo de frotado con guantes estériles. El dispositivo de frotado también puede ser sujetado con la bolsa de plástico invirtiendo sobre la mano la parte interior de la bolsa hacia fuera, tal y como se muestra en la Figura 1.

Frotar con fuerza, con un movimiento en zigzag, la superficie completa en cuestión en dos direcciones perpendiculares, cambiando la cara que se utiliza del dispositivo de frotado. Volver a introducir el dispositivo de frotado

en la bolsa de plástico y cerrarla para protegerlo de cualquier tipo de contaminación y para que permanezca húmedo hasta el momento del análisis.

### **Figura 1. Sujeción de dispositivo de frotado con una bolsa de plástico**



Tras la recogida de muestras, frotar sobre la zona muestreada un paño con alcohol.

## **12 TRANSPORTE, ALMACENAMIENTO E INICIO DEL ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

Transportar las muestras en una caja térmica (8.3) a una temperatura de entre 1 y 8 °C.

En caso de que sea necesario, almacenar las muestras en el laboratorio a una temperatura de 3 °C ± 2 °C. Analizar las muestras lo antes posible, preferiblemente en un periodo máximo de 24 horas tras su recepción en el laboratorio y nunca después de transcurridas 36 h desde el muestreo, según lo establecido en la norma EN ISO 7218 (cláusula 8.3, 3er. párrafo empezando por el final y siguiente párrafo sobre productos perecederos). El tiempo transcurrido hasta que se efectúa el análisis debe quedar registrado y constar en el informe analítico.

## **13 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS**

### **13.1 MÉTODO DE EMPLEO DE HISOPOS**

Añadir en el tubo que contiene el hisopo un volumen suficiente y al menos 9 ml de caldo Fraser semi (véase norma EN ISO 11290-1) para que la punta de este se encuentre sumergida totalmente en el caldo.

Mezclar bien el contenido de los tubos en los que se encuentran los hisopos con un agitador (8.5) durante 30 s.

A continuación, seguir el método de detección de *L. monocytogenes* de la norma EN ISO

11290-1 u otro método alternativo validado.

### 13.2 MÉTODO DE EMPLEO DE ESPONJAS, PAÑOS O GASAS

Añadir un volumen de caldo Fraser semi 9 veces superior al peso del dispositivo de frotado húmedo, tal y como se indica en el apartado 10.2 (véase EN ISO 11290-1), dentro de la bolsa de plástico que contiene el dispositivo de frotado para que quede sumergido totalmente en el caldo.

Tratar el contenido de las bolsas en un homogeneizador peristáltico (8.6) durante 1 min.

A continuación, seguir el método de detección de *L. monocytogenes* de la norma EN ISO 11290-1 u otro método alternativo validado.

## 14 EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados deben quedar registrados como: presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en el lugar del muestreo. Asimismo, se debe indicar, si se conoce, el tamaño de la zona muestreada.

## 15 REFERENCIAS

- [1] Carpentier B, Cerf O (2011). Review -- Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145:1-8.
- [2] Anónimo (2005). Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios. *Diario Oficial de la Unión Europea*. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:EN:PDF> [último acceso: 5 de julio de 2012: 26 págs.]
- [3] Comisión del Codex Alimentarius (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. CAC/GL 61-2007. [http://www.codexalimentarius.net/web/more\\_info.jsp?id\\_sta=10740](http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=10740) [último acceso: 23 de marzo de 2012].
- [4] FDA (2008). Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready-To-Eat Foods; Draft Guidance. US Food and Drug Administration, Department of

- Health and Human Services. <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodProcessingHACCP/ucm073110.htm> [último acceso: 31 de enero de 2011]
- [5] Tompkin RB, Scott VN, Bernard DT, Sveum WH, Gombas KS (1999). Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. Dairy Food and Environmental sanitation, 19:551-62.
- [6] Anónimo (2004). ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
- [7] Chasseignaux E, Gerault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. FEMS Microbiology Letters, 210:271-5.
- [8] NSW (2008). Food Authority for meat processors and retail meat licensees. *Listeria* Management Program NSW/FA/FI034/0809. [http://www.foodauthority.nsw.gov.au/Document\\_s/industry\\_pdf/listeria-management-program.pdf](http://www.foodauthority.nsw.gov.au/Document_s/industry_pdf/listeria-management-program.pdf) [último acceso: 27 de enero de 2011: 40 págs.]
- [9] Tompkin RB (2004). Environmental sampling: A tool to verify the effectiveness of preventive hygiene measures. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 95:45-51.
- [10] Mc Namara AM (2007). Maîtrise des contaminations *Listeria* spp des surfaces: expérience aux USA dans le secteur des produits carnés. Colloque Sécurité et qualité des aliments Paris, France, 4 décembre. <http://sillikeratcommunications.com/france/html/actualities/programme07.php>, [último acceso: 06 de abril de 2010]
- [11] Anónimo (2011). Sampling and Testing (Chapter 5) in Meat Hygiene Manual of Procedures of the Canadian Food Inspection Agency. <http://www.inspection.gc.ca/food/meat-and-poultry-products/meat-hygiene-manual-of-procedures/eng/1300125426052/1300125482318> [último acceso: 10 de febrero de 2012]
- [12] Billaux F, Boubetra A, Denis C, Garry P, Jehanno D, Kobilinsky A. Recommendation for the revival of injured microbes with intent to detect and count them (resultados sin publicar).
- [13] Davies RH, Wray C (1996). Determination of an effective sampling regime to detect *Salmonella* Enteritidis in the environment of poultry units. Veterinary Microbiology, 50:117- 27.

- [14] Anónimo (1997). EN 1276: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension tests for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the food, industrial, domestic and institutional areas - Test methods and requirements (phase 2, step 1).
- [15] Anónimo (1997). EN 1650. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics in food, industrial, domestic, and industrial areas - Test method and requirements (phase 2 step 1).
- [16] Anónimo (2001). EN 13697. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative nonporous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and industrial areas - Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step 2).
- [17] Anónimo (2002). EN 13704. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and industrial areas - Test and requirements (phase 2, step 1).
- [18] Espigares E, Bueno A, Fernández-Crehuet M, Espigares M (2003). Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, 55:137-40.