

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA



“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN QUESOS
FRESCOS ARTESANALES PROVINCIA DE HUAROCHIRÍ, LIMA-PERÚ”

GIANNINA CABANILLAS TORRES

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado(a) en Biología

Asesor: Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña

Lima, Perú

2019

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA



“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN QUESOS
FRESCOS ARTESANALES PROVINCIA DE HUAROCHIRÍ, LIMA-PERÚ”

GIANNINA CABANILLAS TORRES

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado(a) en Biología

Asesor: Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña

Lima, Perú

2019

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGIA



“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN QUESOS
FRESCOS ARTESANALES PROVINCIA DE HUAROCHIRÍ, LIMA-PERÚ”

GIANNINA CABANILLAS TORRES
MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR Y ASESOR

Presidente: Blgo. Miguel Cobos Zelada

Secretario: Blgo. Alcides Guerra Santa Cruz

Vocal: M.V. Franco Ceino Gordillo

ASESOR (A): Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña

*Los desafíos son los que hacen la vida interesante,
y superarlos es lo que hace la vida significativa.*

Joshua J. Marin

Dedicatoria

A Dios por iluminar mi camino., a mis padres por siempre confiar en mí a pesar de las adversidades y por recibir su apoyo incondicional, a mis hermanos por sus sabios consejos; a todos ellos les agradezco por cada momento y apoyo brindando, muchas gracias adorada familia.

Agradecimientos

A mi padre por su apoyo incondicional desde los inicios de mi carrera universitaria.

A mi madre por sus sabios consejos para mantenerme siempre optimista y brindarme todo su amor.

A mi hermano Pepe por sus consejos, por su apoyo, por todas las cosas que ha hecho por mí, y que hasta el día de hoy se las agradezco infinitamente.

A Juan Pablo que con su apoyo y paciencia desde el comienzo de la producción de esta tesis ha sido testigo del esfuerzo y del sacrificio y sus ánimos de alentarme siempre me han mantenido motivada.

A mi alma mater, la Universidad Ricardo Palma que me vio desarrollarme desde los inicios en mi formación como profesional.

A mi asesor de tesis, Blgo. Juan Carlos Ramos porque me dio la oportunidad de introducirme al mundo de la microbiología y desde entonces sigo el camino brindado desde sus enseñanzas, además por sus consejos y su tiempo en la elaboración de esta tesis.

A mis amigos más cercanos, que desde siempre estuvieron animándome, aconsejándome, ayudándome, guiándome, haciendo que no me rinda en el proceso de esta tesis, muchas gracias, amigos, Yatsen y Zsasa.

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE TABLAS	11
RESUMEN	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	16
1.3 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	17
1.4 ASPECTOS ÉTICOS DE LA INVESTIGACIÓN	17
1.5 OBJETIVO GENERAL.....	18
1.6 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
2. MARCO TEÓRICO.....	19
2.1 GÉNERO <i>LISTERIA</i>	19
2.1.1 <i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i>	19
2.1.2 SEROTIPOS.	20
2.1.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS.....	20
2.1.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS.....	21
2.1.5 REQUERIMIENTOS NUTRICIONALES.	23
2.1.6 FACTORES DE VIRULENCIA Y PATOGENIA.	23

2.1.7	DISTRIBUCIÓN.....	25
2.2	LISTERIOSIS	26
2.2.1	FISIOPATOLOGÍA DE LA INFECCIÓN.....	27
2.2.2	INMUNIDAD Y POBLACIONES EN RIESGO.....	28
2.2.3	CUADRO CLÍNICO.....	28
2.2.4	EPIDEMIOLOGÍA.....	29
2.2.5	DIAGNÓSTICO.....	31
2.2.6	TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN.....	32
2.3	QUESO	32
2.3.1	DEFINICIÓN.....	32
2.3.2	QUESOS FRESCOS.....	32
2.3.3	QUESOS FRESCOS ARTESANALES.....	33
2.3.4	EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA.....	33
2.3.5	CONSUMO PER-CAPITAL ANUAL DE QUESO FRESCO.....	34
3.	ANTECEDENTES	35
4.	HIPÓTESIS.....	42
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1	LUGAR DE EJECUCIÓN	43
5.2	TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	43
5.3	DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	43
5.4	VARIABLES	43
5.4.1	VARIABLE DEPENDIENTE.....	43

5.4.2	VARIABLE INDEPENDIENTE.	43
5.5	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	44
5.6	MUESTREO.....	45
5.6.1	TAMAÑO DE LA MUESTRA.	45
5.7	PROCEDIMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS.....	46
5.7.1	MATERIALES E INSTRUMENTOS UTILIZADOS.	46
5.7.2	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	48
6.	RESULTADOS.....	52
7.	DISCUSIÓN	57
8.	CONCLUSIONES	61
9.	RECOMENDACIONES.....	62
10.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
11.	ANEXOS	70

Índice de figuras

<i>Figura 1. Factores de virulencia de Listeria monocytogenes.</i>	<i>24</i>
<i>Figura 2. Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de Listeria monocytogenes ...</i>	<i>51</i>
<i>Figura 3. Placa de medio Oxford con colonias sospechosas de Listeria spp.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 4. Placa de medio PALCAM con colonias sospechosas de Listeria spp.</i>	<i>52</i>
<i>Figura 5. Prueba HiListeria™ - Kit de identificación.....</i>	<i>55</i>
<i>Figura 6. Resultados de las muestras procesadas de los quesos frescos.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 7. Muestras de quesos para su respectivo análisis.....</i>	<i>73</i>
<i>Figura 8. Caldos Bleb para ser añadidos a las muestras de quesos.</i>	<i>73</i>
<i>Figura 9. Incubadora con muestras de quesos ya preparados con los caldos de enriquecimiento.</i>	<i>74</i>
<i>Figura 10. Lectura de Placas a las 48 horas.....</i>	<i>74</i>
<i>Figura 11. Cepario utilizado para los análisis de las muestras.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 12. Venta de quesos frescos artesanales en mercado de Huarochirí.</i>	<i>75</i>
<i>Figura 13. Reaccion de catalasa positivo de muestra.</i>	<i>76</i>
<i>Figura 14. Prueba de motilidad.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 15. Observación de bacilos Gram positivos en coloración Gram.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 16. Prueba de CAMP negativo.</i>	<i>78</i>

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Características bioquímicas del género Listeria spp.</i>	21
<i>Tabla 2. “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano”</i>	34
<i>Tabla 3. Resultados obtenidos en aislamiento por medios selectivos.</i>	53
<i>Tabla 4. Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en los 20 aislados catalasa positivos.</i>	54

Resumen

La bacteria *Listeria monocytogenes* es el agente etiológico de la listeriosis humana. Se trata de un bacilo Gram positivo e intracelular, que no es esporulado ni presenta cápsula y que al microscopio puede ser observado de tres formas: individuales, en grupos pequeños o en cadenas cortas.

Debido a que *Listeria monocytogenes* es uno de los principales agentes patógenos transmitidos por alimentos y que las Enfermedades transmitidas por alimentos representan un grave problema de salud pública, se decidió estructurar este trabajo con el propósito de determinar la presencia de esta bacteria en un alimento consumido de forma popular; el queso fresco.

Para determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* se tomaron 80 muestras de quesos frescos artesanales de la provincia de Huarochirí, utilizando la metodología FDA/BAM. Los resultados mostraron que ninguna de las 80 muestras resultó positiva para *Listeria monocytogenes*, 48 muestras (61%) no presentaron ningún tipo de crecimiento, 20 muestras (25%) se hallaron positivas para *Listeria* spp., mientras que 12 muestras (15%) resultaron ser bacterias Gram positivas.

Palabras clave: Listeriosis humana, *Listeria monocytogenes*, queso fresco, FDA/BAM.

Abstract

The bacteria *Listeria monocytogenes* is the etiological agent of human listeriosis. This is a bacillus gram positive and intracellular, that is non sporulated nor has capsule, and that can be observed in three forms by the microscope: individual, in small groups or in short chains.

Given the fact that *Listeria monocytogenes* is one of the main pathogens agents transmitted by food and that foodborne diseases represent a massive public health problem, we decided to structure this study on the purpose of determining the presence of this bacteria in a well and popular consumed food; such as fresh cheese.

To determine the presence of *Listeria monocytogenes*, 80 samples of fresh artisanal cheeses from the province of Huarochirí were taken, using the FDA / BAM methodology. The results showed that none of the 80 samples were positive for *Listeria monocytogenes*, 48 samples (61%) did not present any type of growth, 20 samples (25%) were positive for *Listeria* spp., While 12 samples (15%) they turned out to be Gram-positive bacteria.

Keywords: Human listeriosis, *Listeria monocytogenes*, fresh cheese, FDA/BAM

1. Introducción

Listeria monocytogenes es el agente infeccioso causante de la listeriosis humana. Este es un bacilo Gram positivo, pequeño, no ramificado, anaerobio facultativo y capaz de proliferar dentro de un amplio abanico de temperaturas (1 °C a 45 °C) y elevada concentración de sal, estos microorganismos son móviles a temperatura ambiente, pero no a 37 °C (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2013). El género *Listeria* actualmente comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Dos de estas especies, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son potencialmente patógenas para el hombre y animales y la enfermedad que ocasionan se conoce con el nombre de listeriosis. (Elika, 2006)

La listeriosis humana es una enfermedad esporádica que se ve durante todo el año, con epidemias focales y casos esporádicos de listeriosis asociados con el consumo de carne poco cocinada, leche o queso no pasteurizados o contaminados y vegetales crudos mal lavados. Debido a que puede crecer en un amplio intervalo de valores de pH, así como a temperaturas frías, los alimentos con un pequeño número de microorganismos pueden presentar una notable contaminación tras un período prolongado de refrigeración (Murray et al., 2013). La listeriosis es una enfermedad que presenta baja morbilidad, pero de elevada tasa de mortalidad (20-30%) comparada a la de otras toxiinfecciones alimentarias (TIA) y que afecta a sectores poblacionales de elevada susceptibilidad. Ello convierte a *Listeria monocytogenes* en un microorganismo oportunista que afecta a inmunodeprimidos (cáncer, diabetes, alcohólicos, SIDA, trasplantados, enfermos crónicos de diversas afecciones), mujeres embarazadas, recién nacidos y personas mayores. (Doyle y Buchanan, 2013).

El queso elaborado artesanalmente es uno de los productos lácteos que ofrece condiciones favorables para el crecimiento de listerias, porque es elaborado a partir de leche cruda sin pasteurización, inadecuadas prácticas de manufactura, que sumados a la alta humedad y al hecho de no estar sujetos a controles de almacenamiento, distribución y expendio, se convierten en un vehículo potencial de transmisión para *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos patógenos (Espinoza, De la torre , Salinas y Sánchez, 2004). La bacteria puede persistir en los equipos de la industria alimentaria y en las superficies de los locales, en particular a baja temperatura (Pérez, Salazar y Gamarra, 2013). Este patógeno está emergiendo como una importante bacteria patógena transmitida por los alimentos. Las explicaciones de esta emergencia comprenden cambios importantes en la producción (riego con aguas servidas), procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos (Pérez y Chávez, 2012).

El presente estudio tiene como objetivo determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales de la provincia de Huarochirí. La metodología utilizada para determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* es la establecida por el Food and Drug Administration / Bacteriological Analytical Manual (FDA/BAM) así podremos confirmar si los quesos que se venden en Huarochirí son aptos para la comercialización a la población.

1.1 Planteamiento del problema

Las enfermedades de transmisión alimentaria (ETA) son un problema de salud pública creciente tanto en países del primer como del tercer mundo siendo *Listeria monocytogenes* uno de los principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos.

El Perú es un país en vías de desarrollo donde existe mucha informalidad, la elaboración de sus productos de forma artesanal no cumple con las normas sanitarias establecidas para que sus productos sean aptos para el consumo. En los últimos años han aumentado los casos de listeriosis, afectando principalmente a niños y mujeres en estado de gestación debido al consumo de productos lácteos, como quesos elaborados de manera artesanal son distribuidos en los mercados sin ninguna restricción y sin contar con ningún registro sanitario. Es importante realizar estudios sobre *Listeria spp* en este tipo de productos, ya que en nuestro país no se cuenta con mucha información sobre esta bacteria lo que no se da la debida importancia que ayude a prevenir los casos de listeriosis ocasionados por la ingesta de alimentos contaminados.

1.2 Formulación del problema

¿Existe presencia de *Listeria monocytogenes* en los quesos frescos artesanales de la provincia de Huarochirí, Lima-Perú?

1.3 Justificación de la investigación

El queso fresco, es el que más se produce y consume en el Perú, los mercados peruanos en su mayoría son abastecidos por quesos elaborados de manera artesanal. En la ciudad de Lima, los quesos que llegan a los diferentes mercados, provienen de varias regiones del Perú, siendo uno de ellos la provincia de Huarochirí, la comercialización de estos quesos de dicha región se da por su cercanía, sabor y a su vez por ser unos de los mayores productores de quesos en el departamento de Lima, estos quesos se suelen identificar en el mercado por ser de color blanquecino, la textura es cremosa y suave, hay de tipo salado y no salado, se utilizan en su mayoría para preparar platos típicos como la papa a la huancaína, sin embargo la elaboración de algunos de estos quesos, se dan de manera insalubre, y a su vez no contando con las normas sanitarias impuestas por organismos como DIGESA necesarias para su producción, elaboración y su libre distribución a los mercados de Lima y provincias hace que estos productos puedan convertirse en un foco infeccioso de *Listeria monocytogenes* que puede afectar a la población.

Metodologías ya establecidas como lo es FDA/BAM para detectar *Listeria monocytogenes* que han sido empleadas en este estudio han permitido identificar la presencia de *Listeria spp.* Dado que existen pocos estudios que evalúan la detección de listeria monocytogenes en quesos frescos en nuestro país, la presente investigación permitirá detectar *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* mejorando de esa manera la calidad microbiológica de los quesos artesanales, detectándolo a tiempo en estos alimentos para prevenir futuros casos de listeriosis en el Perú.

1.4 Aspectos éticos de la investigación

Esta investigación científica se basa en hacer un análisis general a quesos producidos artesanalmente que de alguna manera podría causar daño a la población si no se han elaborado de

la manera correcta y al detectar la bacteria *Listeria monocytogenes* que es el objeto de estudio en esta investigación, hacer una alerta a la población de que deben ser más cuidadosos al comprar sus quesos y concientizar a los que lo elaboran los quesos de respetar las buenas prácticas.

1.5 Objetivo General

- Determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales de la provincia de Huarochirí.

1.6 Objetivos Específicos

- Aislar la bacteria *Listeria monocytogenes* en muestras de quesos frescos artesanales de los mercados de Huarochirí, mediante ensayo microbiológico normalizado FDA/BAM.
- Identificar mediante pruebas bioquímicas las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de los quesos frescos y embutidos artesanales.

2. Marco Teórico

2.1 Género *Listeria*

El género *Listeria* pertenece a la subrama de *Clostridium* junto con *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* y *Brochothrix*. La posición filogenética de *Listeria* es compatible con su bajo contenido de G+C (36 a 42%). En base a la base a la hibridación DNA-DNA, el análisis de las enzimas multiloculares y al secuenciado de rRNA 16S, el género *Listeria* comprende en la actualidad 6 especies divididas en dos líneas de descendencias: (i) *L. monocytogenes* y las especies emparentadas cercanamente *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y (ii) *L. grayi*. (Doyle et al., 2013). Las especies patógenas reconocidas son *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*, siendo que *L. monocytogenes* es reconocido como un patógeno para el ser humano y *L. ivanovii* es reconocido como el organismo causante de listeriosis animal (Murray et al., 2013).

2.1.1 *Listeria monocytogenes*.

Es una bacteria Gram positiva y catalasa positiva, anaerobia facultativa, no esporógena, con forma de bacilos cortos, a veces cocoides. Su tamaño consiste entre 0,5 a 2 micras de largo por 0,5 micras de ancho. Este microorganismo presenta como particularidad una motilidad tipo “tumbling” a los 20 - 25°C, pero es inmóvil a los 35°C. Cuando se observan las colonias a la luz oblicua (iluminación de Henry) poseen apariencia azulada-gris a verde. Es un microorganismo psicótrofo y su rango de crecimiento oscila entre 0°C a 45°C siendo las condiciones óptimas entre 30°C y 37°C. Puede crecer a niveles de pH entre 4,4 y 9,4 y con una actividad de agua (a_w) $\geq 0,90$. Tolera concentraciones de NaCl de hasta 20% (RENALOA, 2011).

Listeria monocytogenes es una bacteria oportunista. Puede multiplicarse fuera del huésped aún con bajas exigencias en cuanto a nutrientes. Comparada con otras bacterias patógenas que no producen esporas y que son transmitidas por los alimentos, *Listeria monocytogenes* presenta la particularidad de resistir distintas condiciones de estrés como congelación, secado, acidez y frío, pudiéndose adaptar a éstas mediante la producción de biofilms (Ryser y Donnelly, 2015).

2.1.2 Serotipos.

Basado en reacciones serológicas del antígeno somático O y el antígeno flagelar con antisueros específicos, se han conseguido diferenciar 13 serotipos de *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7 (Pascual y Calderón, 2000). Más del 90% de los aislados bacterianos de casos de listeriosis humana son los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b. Siendo que los aislados pertenecientes al serotipo 4b son responsables de 33-50% de casos humanos esporádicos mundiales y fueron los causantes del mayor surto de enfermedades transmitidas por alimentos en Europa y Estados Unidos en 1980. En contraposición, la mayoría de los aislamientos en alimentos en diversos países pertenecen en su mayoría a los serotipos 1/2 (1/2a, 1/2b y 1/2c) (Doyle et al., 2001).

2.1.3 Características bioquímicas.

La bacteria *L. monocytogenes* es anaerobia facultativa, no esporulada, catalasa positiva, oxidasa negativa y con crecimiento rápido en agar sangre, produciendo B-hemolisis. Sin embargo, se han relatado en la literatura aislamientos de *L. monocytogenes* con hemolisis débil o inclusive no hemolíticos y catalasa negativos (Liu et al., 2008). Todas las características bioquímicas del género *Listeria spp.* se encuentran en la tabla 1.

Tabla 1. Características bioquímicas del género *Listeria* spp.

<i>In vitro</i> Character	Species ^a					
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. grayi</i>
Gram staining	+	+	+	+	+	+
Catalase test	+	+	+	+	+	+
β-Hemolysis on blood containing agar	+	++ ^c	-	-	±	-
Lipase production	+	+	-	-	+	-
Amino acid peptidase activity	-	+	+	+	+	+
Aesculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+
β-D glucosidase	+	+	+	+	+	+
Acid Production from:						
D-mannitol	-	-	-	-	-	+
L-rhamnose	+	-	+	±	-	±
D-xylose	-	+	-	+	+	-
α-Methyl D-mannoside	+	-	+	+	±	±
CAMP Test^b with:						
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	-	+	-
<i>Rhodococcus equi</i>	-	+	-	-	-	-

^a +, positive reaction; -, negative reaction; ±, variable or weak reaction.
^b Enhancement of hemolysis reaction.
^c ++, strong haemolytic reaction

Fuente: Liu, D. (2008). *Handbook of Listeria monocytogenes*.

2.1.4 Características físicas.

Esta bacteria psicotrópica es capaz de comenzar su crecimiento en temperaturas que varían de 0 a 45 grados centígrados, siendo que la temperatura óptima de crecimiento está entre 30 y 37 grados centígrados y que el crecimiento ocurre más lentamente en temperaturas menores. Las temperaturas bajo 0 grados pueden preservar o inactivar moderadamente a esta bacteria. Por eso, la sobrevivencia y el daño durante el almacenamiento en congelamiento depende del sustrato y del índice de congelamiento. En general, *L. monocytogenes* es inactivada por exposición a temperaturas mayores de 50 grados centígrados (Doyle et al., 2001).

Esta característica de resistir bajas temperaturas es una propiedad particular de *L. monocytogenes*, lo que le permite multiplicarse en temperaturas bajas, ayudando a su proliferación en los alimentos contaminados almacenados en refrigeración. Por ello, la listeriosis se asocia con la ingestión de

productos alimenticios mantenidos a temperaturas de refrigeración durante un intervalo de tiempo (Pascual et al., 2000). A temperatura ambiente (20 – 25 °C) la bacteria es activamente móvil, debido a la presencia de flagelos peritricos, los mismos que le otorgan un movimiento característico de salto y rotación (Pascual et al., 2000). En la temperatura corporal de 37°C esta especie bacteriana no sintetiza más que uno o dos flagelos, los cuales tienden a situarse en la región polar de la bacteria (Rocourt y Buchrieser, 2007) por esta razón, una característica importante de virulencia asociada al movimiento es la capacidad de loco moverse hacia dentro de las células y entre las células del huésped (Saldivar, Davis, Johnson y Ricke, 2017).

El intervalo de pH para el óptimo crecimiento bacteriano de *L. monocytogenes* varía entre 5.6 a 9.6, siendo su valor de pH óptimo de 7.5, aunque esta bacteria puede iniciar su crecimiento en laboratorio en valores de pH de 4.4. En valores de pH menores la bacteria puede sobrevivir, pero no multiplicarse (Pascual et al., 2000). La bacteria es capaz de crecer en presencia de 10 – 12% de cloruro de sodio y puede tener una multiplicación elevada en medios con moderadas concentraciones de sal (6.5%). Esta bacteria sobrevive por largos periodos en medios con concentraciones altas de sal, pudiendo incrementar aún más la sobrevivencia cuando la temperatura está reducida (Doyle et al., 2007). Las especies de listeria se parecen a la mayoría de los enterococos por ser capaces de hidrolizar la esculina, de crecer en presencia del 10% o 40% (volumen/peso) de bilis, en aproximadamente el 10% de NaCl, en medios con un 0,025% de acetato de talio y en medios con un 0,04% de telurito potásico, pero a diferencia de los enterococos no crecen en presencia de un 0,02% de azida sódica (Jay, 1992).

2.1.5 Requerimientos nutricionales.

Las necesidades nutritivas de las listerias son las típicas de otras muchas especies de bacterias grampositivas. Crecen bien en muchos medios ordinarios tales como el caldo con infusión de cerebro y corazón, el caldo con soja y tripticasa, y el caldo con triptosa. (Jay,1992). Actualmente, se pueden encontrar en el mercado caldos y agares selectivos para el aislamiento de esta bacteria de muestras no estériles, como alimentos, muestras ambientales y heces. Los agares PALCAM y Oxford fueron recomendados por la ISO 11290-1, 2 en 1996 y en 1998 como medio primario y secundario para el aislamiento de todas las especies de *Listeria spp.*, que crecen en estos medios con un formato único de ojo de pez (fish-eye). Para el caso particular de *L. monocytogenes* existen medios selectivos basados en substratos cromogénicos (Liu et al.,2008).

2.1.6 Factores de virulencia y patogenicia.

La patogenicidad de esta bacteria se atribuye a la capacidad de adhesión, invasión y multiplicación dentro de diversas células no fagocíticas (Gilot , André, y Content, 1999). Los factores de virulencia más conocidos de *L. monocytogenes* están representados por las internalinas, proteína p60, proteína Lap, listeriolisina O, proteína Act y fosfolipasas C. (Farley, 2018).

Un diagrama esquematizando la participación de estos factores de virulencia se presenta en la figura 1.

Los genes *inlA* e *inlB* codifican las internalinas A y B, respectivamente. Estas proteínas se expresan en la superficie bacteriana en el proceso de adhesión e invasión al organismo. La internalina A interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas, como las intestinales; mientras que la internalina B interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales no polarizadas, como los hepatocitos (Farley, 2018). La internalina A se contacta con un receptor

de célula eucariota I-E-caderina, lo que promueve la fijación específica de la bacteria y su entrada en las células epiteliales del individuo (Saldivar et al., 2017).

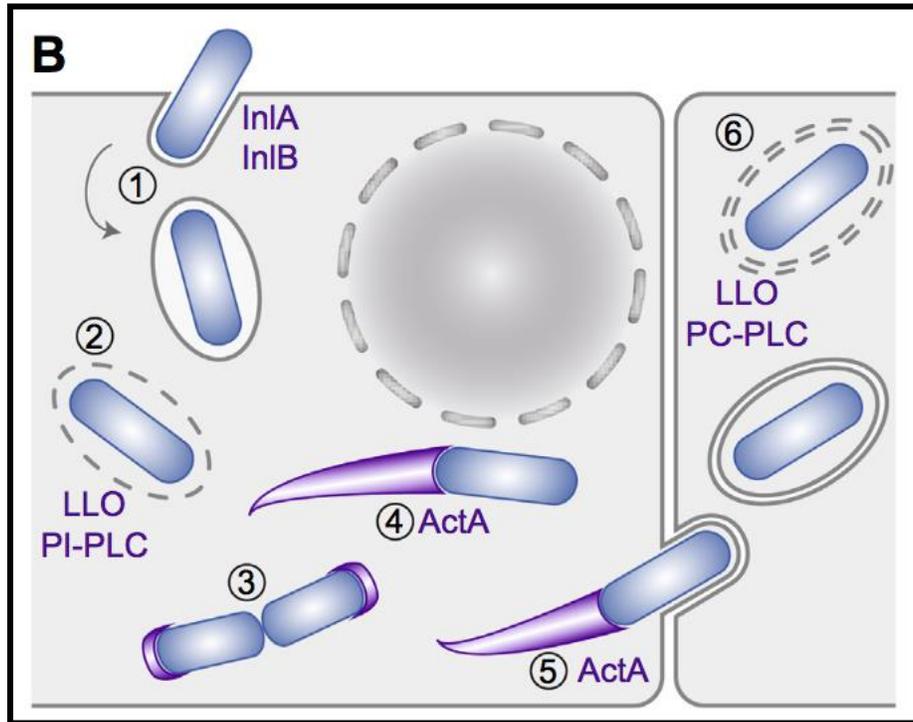


Figura 1. Factores de virulencia de *Listeria monocytogenes*.

Fuente: Cossart, P y Lebreton, A. (2014). A trip in the “new microbiology” with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. Federation of European Biochemical Societies (FEBS).

Otro factor de virulencia relacionado a la invasión de *L. monocytogenes* a las células eucarióticas es la proteína p60, la misma que tiene participación en la invasión a los fibroblastos. La proteína de adhesión LAP es responsable por la adherencia de *L. monocytogenes* a linajes de cultivos celulares intestinales, lo cual sugiere su participación en la fase intestinal de la listeriosis (Saldivar et al., 2017).

Una vez que esta bacteria se ha unido a un receptor específico, comienza la fosforilación y activación de una serie de proteínas intermedias en la célula del hospedero, estas proteínas son capaces de interactuar y reorganizar los filamentos de actina del citoesqueleto de la célula blanco,

facilitando la endocitosis y formación del fagosoma (Olivares, 2009). *L. monocytogenes* tiene la capacidad de escapar de las vacuolas fagocíticas (fagolisosomas), entrar en el citoplasma y replicarse. Un factor de virulencia es necesario para que esto suceda: la listeriolisina O (LLO) (Cossart y Lebreton, 2014). LLO es activada por el pH ácido de la fagolisosoma, esta proteína se une a la superficie de la membrana celular para formar poros que permitan a la bacteria escapar de las vacuolas al citoplasma (Doyle et al., 2007).

En el citoplasma de las células hospederas, la bacteria es capaz de avanzar debido a la continua polimerización de los filamentos de actina que propulsan a la bacteria hacia la membrana de las células hospederas. La proteína de superficie Act A es la responsable de proveer esta motilidad basada en actina a en *L. monocytogenes* (Dussurget, Pizarro-Cerda, y Cossart 2004). Al llegar a la superficie de la membrana celular, la bacteria forma pseudópodos que al tomar contacto con la célula vecina son fagocitados, con la finalidad de dejar a la bacteria incluida en los fagosomas de la célula vecina y así poder comenzar un nuevo ciclo infeccioso (Larraín y Carvajal, 2008).

Las fosfolipasas C (PI-PLC) son enzimas que rompen membranas de las células hospederas al hidrolizar sus lípidos, como fosfatidilcolina y fosfatidilinositol. El paso directo de célula a célula está determinado por estas enzimas (Murray et al., 2013).

2.1.7 Distribución.

Listeria monocytogenes es un microorganismo ubicuo. Se encuentra en el intestino de animales y personas que actúan como portadores y, también, ampliamente distribuido en ambientes naturales como suelo, agua, efluentes, pastos y ensilados dónde sobreviven durante períodos extensos de tiempo. También se encuentra en el suelo, paredes, techos y equipos de plantas de procesado de alimentos y se ha aislado de una gran variedad de alimentos listos para consumo (RTE) de origen vegetal, lácteo, marino o cárnico y en ensaladas y frutas. Los alimentos listos para

consumo (RTE) se consideran como aquéllos preparados para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otros tratamientos culinarios que reduzcan a un nivel aceptable la presencia de microorganismos preocupantes. (Elika, 2008) La bacteria también es un residente transitorio del tracto intestinal de humanos, teniendo de 2 a 10% de la población como reservorios sin signos clínicos de la enfermedad (Buchanan, Gorris, Hayman, Jackson y Whitning, 2017)

Muchos estudios muestran que *L. monocytogenes* está ampliamente distribuida en plantas de procesamiento de alimentos. La bacteria puede encontrarse contaminando superficies que contactan con los alimentos, incluyendo al producto alimenticio; y puede persistir debido a una limpieza ineficaz, falta de sanitización, precario diseño de planta Y/o pobre control de movimiento de ambientes o equipos (Buchanan et al., 2017).

Una característica esencial para esa persistencia puede ser la capacidad de *L. monocytogenes* de adherirse a las superficies formando biopelículas de exopolisacaridos, y de esta forma generar una cierta resistencia a los procesos de limpieza y desinfección. Esta característica se reconoce como fundamental para facilitar la contaminación tanto de los equipos y utensilios de las plantas de procesamiento, como de los alimentos procesados (Perez, Mercado y Carrascal, 2008).

2.2 Listeriosis

La listeriosis es una enfermedad considerada como ETA, es decir transmitida por el consumo de alimentos contaminados. Esta infección alimentaria de tipo gastrointestinal ocasionada por la bacteria *L. monocytogenes*. Este patógeno ha sido reconocido como un patógeno humano desde 1929, sin embargo, la vía de transmisión de este agente sólo se conoció a partir de 1980, cuando una serie de brotes confirmaron la transmisión alimentaria de esta bacteria. En la actualidad se reconoce que la mayoría de los casos de listeriosis humana son transmitidos por alimentos y la obligatoriedad de su notificación fue declarada desde 2001 (Blackburn y McClure, 2002).

Esta enfermedad presenta una tasa baja de morbilidad, siendo generalmente de 2 – 4 casos a cada 1 millón de habitantes en países occidentales, con presentación de secuelas graves en las personas infectadas. Por el contrario, la tasa de mortalidad es alta, alrededor del 30%, considerándose una enfermedad de tipo grave (Blackburn et al., 2002).

2.2.1 Fisiopatología de la infección.

La ruta natural de infección por *L. monocytogenes* en humanos es vía gastrointestinal. El inóculo oral requerido para producir infección clínica aún no está bien establecido, sin embargo, se puede extrapolar de dosis infecciosas en animales que podría variar entre 10^4 e 10^9 organismos. De esta forma, la dosis infectante puede ser menor en individuos inmunocomprometidos y en personas con una reducida producción de Ácido gástrico por uso de antiácidos, histamina, úlceras gástricas, etc. (Farley, 2018). La infección comienza por las células epiteliales intestinales. *L. monocytogenes* puede colonizar el intestino o atravesar el epitelio intestinal vía transcitosis e invadir los linfonódulos mesentéricos y diseminarse vía torrente sanguínea (Farley, 2018). El hígado y los riñones son órganos alvos de esta bacteria. En estos órganos *L. monocytogenes* es internalizada por los macrófagos hepáticos y esplénicos, en los cuales puede sobrevivir y replicarse. En el torrente sanguíneo la diseminación de esta bacteria puede realizarse virtualmente a cualquier órgano. Esta bacteria tiene una predilección particular por la placenta y por el sistema nervioso central. Al atravesar la barrera materno fetal puede formar abscesos en la placenta, corioamnionitis e infección del feto. Al atravesar la barrera hematoencefálica y alcanzar el sistema nervioso central, puede causar meningitis, encefalitis y abscesos cerebrales (Doyle, 2013). La transmisión humano-humano no ha sido documentada, a excepción de la transmisión vertical de madre a feto y casos raros de contaminación cruzada en hospitales (Farley, 2018).

2.2.2 Inmunidad y poblaciones en riesgo.

La resistencia o inmunidad frente a los patógenos intracelulares, tales como los virus, los parásitos animales, y *Listeria monocytogenes* es mediada por las células T, linfocitos que se originan en la médula ósea y maduran en el timo. A diferencia de las células B, que producen la inmunidad humoral, las células T activadas reaccionan directamente frente a las células extrañas. Una vez que un patógeno se encuentra en el interior de una célula hospedadora, no puede ser alcanzado por el anticuerpo circulante, pero la presencia del patógeno es indicada por cambios estructurales en la célula parasitada y las células T intervienen en la destrucción de esta célula hospedadora invadida, que ya no es reconocida como propia. (Jay, 1992). La listeriosis ha sido reportada siendo de 100 – 1000 veces más común en pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), en comparación con la población general. Sin embargo, la infección por listeria ha disminuido sus tasas debido al resultado de una terapia antirretroviral efectiva con reconstitución inmune (Farley, 2018).

2.2.3 Cuadro clínico.

L. monocytogenes ocasiona una amplia variedad de síndromes, los cuales varían desde una enfermedad leve con síntomas similares con una influenza hasta un cuadro de listeriosis neonatal fulminante, síndrome que se encuentra asociado a una alta tasa de mortalidad (Julián, Jiménez, de Górgolas, Fernández y Fernández, 2001). El periodo de incubación puede variar dependiendo de la presentación y del individuo, generalmente cuando la enfermedad es invasiva el periodo varía entre 20 – 30 días, en adultos de tres a 70 días, en neonatos puede variar de 1 – 4 semanas después del nacimiento (Torres, Sierra, Carrascal y Mercado, 2005)

Durante la gestación, las mujeres presentan un riesgo elevado en hasta 10 veces de presentación de listeriosis. En este caso, la bacteria puede proliferar en la placenta, que sirve como un sitio

privilegiado contra los mecanismos de defensa usuales del organismo. Este tipo de listeriosis puede ser asintomática o tener síntomas leves, como gastroenteritis o síntomas gripales. La infección puede manifestarse en cualquier momento de la gestación, pero es más común en el tercer trimestre, probablemente por un declive más profundo de la inmunidad celular. La mortalidad en este síndrome es rara (Farley ,2018).

A pesar del cuadro relativamente leve y autolimitado de la listeriosis maternal, el impacto de la enfermedad en el feto puede ser devastador. Entre el 20 – 30% de las infecciones relacionadas al embarazo acaban en muerte fetal por abortos espontáneos o nacimiento de fetos muertos. El riesgo de muerte neonatal depende de la edad gestacional al momento de apareamiento de signos clínicos (Farley, 2018). Existe una forma de presentación de listeriosis neonatal llamada granulomatosis infantiséptica, que está caracterizada por la presencia de microabscesos y granulomas particularmente prevalentes en hígado y riñones. Como resultado de este cuadro el feto puede nacer muerto o morir en las primeras horas de vida (Mirón, Ferrás, Mellado, Vidal ,Veloso y Richart, 2002).

2.2.4 Epidemiología.

La listeriosis es más frecuente en individuos inmunocomprometidos, especialmente lactantes y ancianos, y presenta una incidencia máxima en los meses más cálidos. Esta enfermedad representa aproximadamente el 3.8% de las hospitalizaciones y el 27.6% de muertes (Painter y Slutsker, 2007). Cálculos indican una presentación de casos anual de 2,500, sin embargo, muchos de estos casos terminan siendo de carácter leve y no registrados (Murray et al., 2013).

Diversos estudios epidemiológicos realizados determinan que la listeriosis ha aumentado en los últimos 25 años, en comparación con otras ETA's de origen bacteriano. Es por ello que países

como Estados Unidos y Europa han realizado cambios en las regulaciones de la industria alimentaria para disminuir la presentación de casos (Painter et al., 2007).

En la actualidad, y debido a su amplia distribución y su capacidad de crecer en la mayoría de los alimentos no ácidos, son relatados diversos estudios evaluando la presencia del patógeno *Listeria monocytogenes* en diversos alimentos. (Centurión y Takajara, 2004) determinaron una incidencia de 2% de *Listeria monocytogenes* tanto en muestras de carne fresca de pollo como en muestras de verduras frescas obtenidas de diversos mercados y centros de abastecimiento de Lima. (Espinoza et al., 2004) realizaron un estudio para determinar la presencia de esta bacteria en quesos frescos de producción artesanal expendidos en los mercados de Ica, encontrando una prevalencia de 4,05% (3/74) de muestras de quesos positivos para *L. monocytogenes*. (Pérez et al. 2012) determinó una frecuencia de 57% de *Listeria monocytogenes* en puestos de venta que expendían hortalizas, además de evaluar que el 84% de los manipuladores de hortalizas no aplicaban las buenas prácticas de manipulación. En el mismo año, un estudio colombiano evaluó 600 muestras de alimentos listos para el consumo (RTE), encontrando 68 alimentos positivos para *L. monocytogenes*, siendo que los quesos frescos y los quesos madurados mostraron mayor contaminación por esta bacteria (Muñoz, 2011). Otros trabajos determinaron la presencia y riesgo alimentario de *Listeria monocytogenes* en diferentes productos de origen animal y vegetal comercializables. Por ejemplo, (Tolentino, 2014) aisló *Listeria spp* de superficies donde se expendía merluza, en el mercado modelo de la ciudad de Paita-Piura, reportando una frecuencia del 25%. (Flores, 2012) también aisló y caracterizó bioquímicamente especies de *Listeria spp*. obtenidas de lugares de expendio de pollo en mercados del Distrito de Trujillo, encontrando 11/80 muestras positivas, en superficies. Durante las últimas tres décadas, desde el reconocimiento de la listeriosis como una enfermedad transmitida por alimentos, han surgido un gran número de brotes de esta enfermedad, además de

casos esporádicos que han sido reportados en América del norte y Europa por diversos productos alimenticios. Para la industria lechera esta bacteria surgió como una amenaza seria por la primera vez en 1985, con un brote masivo por consumo de quesos estilo mexicano en el sur de California (Swaminathan B y Gerner-Smidt , 2007). Un total de 16 brotes de listeriosis asociados al consumo de quesos han sido reportados, contando con una diversidad de tipos de quesos siendo asociados a los brotes (Melo, Andrew y Faleiro 2015) .

2.2.5 Diagnóstico.

El diagnóstico confirmatorio requiere de aislamiento de *L. monocytogenes* de muestras clínicas, como sangre o fluido raquídeo, e identificación del organismo mediante técnicas microbiológicas standard. Para detección en alimentos, los métodos de cultivo empleados generalmente están divididos en dos etapas: la primera de pre-enriquecimiento en un medio no selectivo, y la segunda etapa de enriquecimiento, que utiliza un medio selectivo (conteniendo diferentes sales y antibióticos). Las colonias de bacterias presuntivas son confirmadas por exámenes morfológicos, bioquímicos, fisiológicos y/o serológicos. La identificación de las bacterias presuntivas demora aproximadamente 4 días y la confirmación de los resultados positivos puede demorar hasta 1 semana (Farley, 2018). Existen métodos de detección rápida basados en búsqueda de antígenos, como inmunocromatografía o Elisa sándwich. Las técnicas más usadas en detección de *L. monocytogenes* en alimentos son inmunoensayo de flujo lateral, ELISA, ELFA (con fluorescencia) y separación inmunomagnética (IMS) (Välímaa, Tilsala-Timisjärvi y Virtanen, 2015). Otros métodos alternativos usados para la detección de esta bacteria en muestras de alimentos son los métodos de amplificación de ADN, como la reacción en cadena de la polimerasa o PCR. Técnicas de PCR de tipo cuantitativo (Qpcr) o PCR en tiempo real (RT-PCR) son muy usadas en microbiología de alimentos (Välímaa et al., 2015).

2.2.6 Tratamiento y prevención.

Como medidas de prevención se adoptan las estrategias contra la diseminación de enfermedades transmisibles por alimentos, como: lavarse bien las manos con agua y jabón, lavar los utensilios de cocina y superficies en contacto con alimentos crudos (tablas de picias, cuchillos, mesas, etc.), lavar los vegetales crudos, evitar la contaminación cruzada entre alimentos crudos y cocidos o listos para consumir (Brock, Madigan, Martinko y Parker, 2003). Cabe resaltar que ya que *L. monocytogenes* es sensible al calor y a la radiación, los alimentos crudos y los utensilios que se emplean para cocinar deben ser debidamente descontaminados. Sin embargo, el riesgo de contaminación no puede ser totalmente eliminado, puesto que el organismo está ampliamente distribuido (Buchanan et al., 2018).

2.3 Queso

2.3.1 Definición.

El queso por definición es básicamente un producto que resulta de la formación del cuajo por la acción de la renina o ácidos sobre la leche, Al cuajo formado, se le separa del suero y según como se procese esa cuajada, esta producirá diferentes tipos de queso, al pasar por un proceso de maduración por acción de las enzimas microbianas y diversos cambios bioquímicos. Los quesos pueden clasificarse de diferentes maneras. Pueden ser producidos de diversas especies mamíferas, vacas y cabras. Algunos de ellos se maduran y a la vez se les incorporan hongos. (DGPA. 2002)

2.3.2 Quesos frescos.

Según la Norma Técnica Peruana (NTP) 202.195, el queso fresco tradicional, es el queso blando, no madurado ni escaldado, moldeado, de textura relativamente firme, levemente granular,

sin cultivos lácticos, obtenido por separación del suero después de la coagulación de la leche pasteurizada, entera, descremada o parcialmente descremada.

2.3.3 Quesos frescos artesanales.

Son quesos que se producen en algunas provincias del Perú, se caracterizan por haberse elaborado, como consecuencia de la coagulación de la “Leche por Renina” (Enzima Digestiva) o por un agente acidificante (jugo de limón o ácido acético diluido). Estos quesos pueden ser blandos o duros, los segundos, son aquellos a los cuales se les ha dejado madurar para propiciar el desarrollo aromas y sabores característicos. Solamente los artesanos experimentados o que han sido enseñados o capacitados utilizan fermentos lácticos; por lo tanto, tienen la posibilidad de obtener quesos más elaborados. La mayoría de los quesos artesanales (aproximadamente un 80%, según Estudio de Comercialización del año 2002), se caracterizan por que se elaboran con “Leche Cruda”. (DGPA,2002)

2.3.4 Evaluación microbiológica.

La Resolución ministerial N° 591-2008 del Ministerio de Salud (MINSA, 2008), dispone de criterios microbiológico que se deben cumplir para el subgrupo de quesos frescos, denotando valores mínimos y máximos que garanticen la inocuidad del alimento, haciendo referencia a la presencia de coliformes, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Listeria monocytogenes* y las *Salmonela spp*. Por ello, se deben realizar controles bacteriológicos rigurosos y periódicos de este producto.

La tabla 2, describe el límite máximo de microorganismos en el queso fresco. Destaca los principales microorganismos presentes e importantes para hacer un buen análisis y controlar estos microorganismos para tener un queso de buena calidad.

Tabla 2. “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano”

I.8 Quesos no madurados (queso fresco , mantecoso , ricotta , cabaña , crema , petit suisse, mozzarella,ucayalino,otros.						
Agente microbiano	Categoria	Clase	n	c	Limite por g	
					m	M
Coliformes	5	3	5	2	5×10^2	10^3
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	3	5	2	10	10^2
<i>Escherichia coli</i>	6	3	5	1	3	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	—
<i>Salmonella spp</i>	10	2	5	0	Ausencia/25 g	—

Fuente: R.M. N° 591-2008/MINSA

2.3.5 Consumo per-capital anual de queso fresco.

El consumo per cápita de leche en el Perú es de 45 kg/hab/año, nivel que resulta bajo comparado con el consumo mínimo recomendado por la Food and Agriculture Organization (FAO) de 120 kg/hab/año (Piskulich,2001). Los derivados lácteos en el Perú también tienen un consumo per cápita bajo. Así por ejemplo en el caso de quesos para el Perú se tiene un consumo per cápita de 0.24 kg/hab/año, mientras que, en Brasil, Argentina, Estados Unidos y Francia es de 2.67, 10.53, 12.79 y 21.4 kg/hab/año respectivamente (Piskulich, 2001).

Como es sabido Lima, representa el grueso de la demanda de queso debido a la concentración poblacional y por un mayor poder adquisitivo, debido a que, dentro de los derivados lácteos, es el producto más costoso. (DGPA, 2002). En Lima, cerca del 50% de los quesos que se consumen son artesanales y provienen de diferentes regiones. (Economika, 2016).

3. Antecedentes

Centurión, et al. (2004) En su investigación denominada, *Determinación de la incidencia de Listeria monocytogenes en pollos frescos y verduras frescas obtenidos en mercados y centros de abastecimiento de Lima metropolitana*, determinó la incidencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de carne fresca de pollo y muestras de verduras frescas obtenidas de diversos mercados y centros de abastecimiento de Lima Metropolitana que fue de un 2% en ambos casos , lo aislaron por los medios selectivos de Oxford y Palcam y usaron pruebas bioquímicas, resultando una muestra de pollo positiva de verduras y espárragos proveniente del mercado de Surquillo.

Espinoza, et al. (2004) En su investigación denominada, *Determinación de listeria monocytogenes en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero - marzo 2003*, demostró Determinar la presencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal expendidos en los mercados de Ica durante el periodo enero – marzo de 2003, se evaluaron 74 muestras teniendo como unidad muestral 200 g según la Norma Técnica Peruana ISO 28329-1. El procesamiento se realizó de acuerdo el manual de bacteriología analítica de la Food and Drug Administration (FDA). De las 74 muestras, 3 (4,05%) presentaban *L. monocytogenes*. Existe *L. monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal, representando un riesgo potencial para la población consumidora.

Martino, et al. (2005) En su investigación denominada, *Determinación de listeria spp. en quesos y embutidos comercializados en cuba*. Determinó la incidencia de la Listeria en 54 muestras de quesos y 98 de embutidos y ahumados, comercializados en Cuba. Para la detección cualitativa

de la *Listeria* se aplicó una prueba de diagnóstico rápido. La *L. monocytogenes* se aisló en queso azul, en salchichón y mortadela. En otras tres muestras (pollo ahumado, chorizo, mortadela) se detectó la *Listeria* por la prueba rápida, sin lograr el aislamiento por el método tradicional, lo cual se debe a la mayor sensibilidad del primer método. La utilización de la técnica cualitativa permitió demostrar la presencia de la *L. monocytogenes* en tres de las muestras analizadas lo cual limita estos productos para su comercialización y consumo.

Baquero, et. al (2006) En su investigación titulada, *Determinación de Listeria monocytogenes en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de Cáqueza*, en el establecimiento Cundinamarca el 80% de las muestras positivas para *Listeria spp* presentaron *Listeria monocytogenes* y el 20% *Listeria innocua*, indicando una prevalencia de la especie patógena para los humanos, aumentando el riesgo en la población de padecer enfermedades gastrointestinales y/o sistémicas especialmente en ancianos, personas inmunosuprimidas, mujeres embarazadas y niños. De la misma forma, se determinó que el 100% de los quesos presentaban alguna contaminación microbiana. Se recolectó información acerca de los procesos de elaboración y de almacenamiento de los quesos, igualmente se observó la forma de manipulación de los alimentos en los puntos de venta.

Kongo, et .al (2006) En su investigación denominada, *Detection and Characterization of Listeria monocytogenes in San Jorge (Portugal) cheese production*, Examinaron 357 muestras de leche cruda y quesos colectadas de la fábrica productora de estos quesos durante un año, haciendo sus análisis correspondientes, siendo dos de las 357 muestras de leche cruda contaminada con *Listeria monocytogenes*.

Gallegos, et al. (2007) En su investigación denominada *Frecuencia de Listeria spp, en quesos colombianos costeños*, confirman que los quesos costeños están frecuentemente contaminados con *Listeria spp*. Demuestran la presencia de *L. ivanovii* patógeno involucrado en algunos casos de infecciones oportunistas en humanos y *L. innocua*; microorganismo utilizado en muchas industrias de alimento como indicador del grado o calidad de sanitización; demuestra que las condiciones de producción y expendio no son adecuadas y que el consumo de queso costeño no es seguro.

Molina, et al. (2009) En su investigación denominada, *Efecto de tiempo y temperatura de cocción en chorizo inoculados artificialmente con Listeria monocytogenes*. Analizaron 60 muestras de chorizos a las que se les inocularon concentraciones de 10³ unidades formadoras de colonias (UFC) g⁻¹ de un pool de 5 cepas de *L. monocytogenes*. Mediante la encuesta se logró establecer que 15 minutos de cocción y 5 minutos de fritura es la forma más frecuente de preparación por parte de los consumidores llegando a la conclusión que los tiempos de 15 minutos de cocción y 5 minutos de fritura son suficientes para inactivar concentraciones de 10³ g⁻¹ de *Listeria monocytogenes* inoculadas artificialmente en chorizos.

Ramírez, et al. (2010) En su investigación denominada, *Detección de Listeria monocytogenes en queso blanco criollo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)*, se evidenció que el PCR demostró ser altamente específico y sensible para *L. monocytogenes*, teniendo ventaja sobre agar PALCAM al evidenciar la presencia específica del patógeno en un tiempo relativamente corto.

Rodríguez, et al. (2011) En su investigación denominada, *Frecuencia de Listeria monocytogenes en tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito, expendidos en mercados de Trujillo, Perú*, determinó la frecuencia de *Listeria monocytogenes* y el comportamiento de los factores de riesgo de contaminación en tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito que se expenden en la ciudad de Trujillo, Perú, durante los años 2010 y 2011, con la finalidad de evidenciar la calidad sanitaria de las hortalizas. Se evaluó un total de 240 muestras. Se determinó que el 57% de los puestos de venta expenden hortalizas en mal estado de conservación, el 84% de los manipuladores de hortalizas no aplican las buenas prácticas de manipulación, el 81% de manipuladores no cumplen con las reglas higiénicas personales y el 77% de los puestos de venta de hortalizas presentan condiciones higiénicas sanitarias no aceptables.

Muños, et al. (2011) En su investigación denominada *Presencia de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008* De las 600 muestras analizadas, 68 fueron positivas para *L. monocytogenes*. Los quesos frescos y los quesos madurados mostraron mayor contaminación de *Listeria monocytogenes* que el resto de los alimentos del estudio. Los resultados indican que estos alimentos son vehículos de transmisión del microorganismo, convirtiéndolos en potenciales alimentos de alto riesgo; deben ser vigilados y controlados por la autoridad competente.

Perlera, (2014) En su investigación denominada, *Determinación de la presencia de Listeria monocytogenes en queso fresco artesanal producido en el departamento de Cabañas que se conoció la presencia de la bacteria en dos del total de 149 muestras estudiadas; sin embargo, en el análisis*

previo (67 muestras): enfocados en la identificación de coliformes, *E. coli*, *Salmonella* y *St. aureus*, como criterios de referencia en la contaminación a través de manipuladores, los límites observados en algunos casos se encontraron fuera de los establecidos por el RTCA1 (67.04.50:08. Alimentos. Criterio Microbiológico para la Inocuidad de Alimentos).

Pinillos, et al. (2012) En su investigación denominada, *Determinación de la presencia de Listeria monocytogenes en leche fresca y queso fresco, comercializados en la provincia de Trujillo*, Se evaluaron 60 muestras de leche fresca y 60 muestras de queso fresco. No se encontró *L. monocytogenes* en leche fresca. Sin embargo, en queso fresco su presencia fue de 3,34 %. En cuanto al cuidado que se debe tener con los factores de riesgo de contaminación en leche fresca y queso fresco, se determinó que estos son altamente inadecuados. Se concluye que *L. monocytogenes* no estuvo presente en leche fresca que se expende en la provincia de Trujillo, pero sí estuvo presente en bajo porcentaje en queso fresco que se expende en la provincia de Trujillo y que existen factores de riesgo de contaminación que posibilitan que este tipo de alimentos actúen como vehículos de transmisión de la listeriosis humana.

Flores, (2012) En su tesis denominada, *Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de Listeria spp. Obtenidas de lugares de expendio de pollo en mercados del Distrito de Trujillo, Departamento La Libertad –Perú en los meses de Mayo – Noviembre del 2011*. Aisló y caracterizó bioquímicamente especies de *Listeria spp.* Obtenidas de lugares de expendio de pollo en mercados del Distrito de Trujillo. Se tomó 80 muestras, repartidas en 40 hisopados de mesas de expendio de pollo y 40 hisopados de tabla para picar. Se logró aislar *Listeria spp.* De 11 muestras obtenidas de las mesas y tablas para picar.

Arrese, et al. (2012) En su investigación denominada Prevalencia de *Listeria Monocytogenes* en queso Idiazabal se analizó 51 muestras de queso procedentes de 10 establecimientos de venta al público; el muestreo fue aleatorio y estratificado. Los análisis se hicieron según el método de detección y de enumeración del procedimiento estandarizado ISO 11290-1. Todas las muestras dieron negativo para *L. monocytogenes*. Sin embargo, el 9,8% dio positivo para *Listeria spp*, distinta de *L. monocytogenes*. Las muestras positivas procedían de dos marcas, dos eran quesos naturales y tres ahumados. La presencia de *Listeria spp*. sugiere que el procesado del queso y la higiene durante el ordeño o durante la fabricación podría ser insuficiente.

García, et al. (2014) En su tesis titulada determinación de *Listeria Monocytogenes* en queso fresco expendido al granel en los mercados de cuenca se analizaron 70 muestras de quesos, el muestreo fue de quince locales dentro de los cuatro mercados , de cada local se realizó una repetición de tres veces para reafirmar que los resultados obtenidos sean confiables, se efectuó por el método de inmunocromatográfica de flujo lateral en 25 gr de muestra según los requerimientos basados en la norma ecuatoriana INEN 1528-2012, las muestras fueron recolectados en dos periodos y posteriormente analizadas en el laboratorio de microbiología de la Universidad del Azuay y validado en un laboratorio certificado AVVE de la Ciudad de Guayaquil. Los resultados obtenidos están basados en variables dependientes para el crecimiento del patógeno, sin embargo, el aislamiento para *Listeria monocytogenes* fueron negativos.

Segura, et al. (2014) En su investigación denominada, *Riesgo alimentario de Listeria monocytogenes, en ensalada de frutas y yogurt natural, en la transmisión de listeriosis humana*, determinaron frecuencia de *Listeria monocytogenes* y los factores de riesgo de contaminación

asociados en ensalada de frutas y yogurt natural, que se comercializaron en la ciudad de Trujillo (Perú) 2012 –2013. Se evaluó 102 muestras de ensalada de frutas y de yogurt natural, de centros de expendio de estos productos. El 42,16% de los centros de expendio los venden en mal estado de conservación; el 63,73% de los manipuladores no aplican buenas prácticas de manipulación, el 59,80% no cumplen las reglas higiénicas personales y el 56,86% de los centros de expendio presentan condiciones higiénicas sanitarias no aceptables.

Tolentino, (2014) En su tesis denominada, *Aislamiento de Listeria spp de superficies donde se expende Merluccius gayi peruanus “Merluza “, en el Mercado modelo de la ciudad de Paita – Piura en los meses de Junio. Noviembre 2013.* Aisló *Listeria spp.* de superficies donde se expende la merluza, en el mercado modelo de la ciudad de Paita –Piura, tomando 100 muestras, logrando aislar *Listeria spp.* de 25 muestras. Los cultivos fueron identificados mediante pruebas de la Catalasa, Oxidasa, motilidad Hemolisis, Xilosa, Manitol, Rhamnosa. Como resultado que el mayor porcentaje de muestras positivas encontradas pertenecen a *Listeria ivanovii* y *Listeria monocytogenes*.

En el 2015 en el Perú, Ante la decisión de la Food and Drug Administration (FDA) de retirar del mercado los helados y otros productos congelados de marca Blue Bell producidos por la empresa Blue Bell Creameries y distribuidos en el Perú por Plaza Vea, debido a un brote de listeriosis, la Dirección General de Salud Ambiental, del Ministerio de Salud, a fin de salvaguardar la salud de las personas y tras comprobar que estos productos han ingresado al país alerta a la población no comprar ni consumirlos. (DIGESA, 2015)

Villanueva, et al. (2017) En su investigación denominada, Formación de biopelículas por *Listeria monocytogenes* aisladas de queso fresco de mercados del Cercado de Lima se analizó 75 muestras de queso fresco provenientes de diez mercados del Cercado de Lima. En el análisis microbiológico se empleó metodologías del Manual de Bacteriología Analítica de la *Food and Drug Administration* (FDA). Se identificó *L. monocytogenes* en 18,7% (14/75) de las muestras de quesos frescos adquiridas en 10 mercados del Cercado de Lima. De estas cepas, 64,3% (9/14) tuvieron capacidad formadora de biopelículas.

4. Hipótesis

Existe la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos preparados de manera artesanal en la provincia de Huarochirí, que se expende en los mercados de la capital de Lima.

5. Materiales y Métodos

5.1 Lugar de ejecución

La investigación se realizó en tres laboratorios: Laboratorio de Biología y Genética Molecular, y Laboratorio de Parasitología; localizados en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma, ubicada en la Avenida Benavides 5440 Santiago de Surco.

5.2 Tipo de investigación

Esta investigación es de tipo descriptivo transversal porque estoy midiendo en un determinado momento por medio de mis variables independientes como lo son mis pruebas analíticas cuantitativas que porcentaje de queso fresco artesanal contiene la bacteria *Listeria monocytogenes*.

5.3 Diseño de investigación

La investigación presentó una metodología no experimental donde el objetivo será aislar la bacteria *Listeria monocytogenes* de una población de 80 muestras de queso fresco, con el fin de recolectar datos en un determinado momento por lo que vuelve a mi estudio transversal.

5.4 Variables

5.4.1 Variable dependiente.

- Presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos

5.4.2 Variable independiente.

- Tratamiento de enriquecimiento

- Medios de cultivo
- Pruebas bioquímicas

5.5 Operacionalización de las variables

Variables	Definición	Tipo de variable	Indicador
Quesos frescos	Queso sin madurar o escasamente madurado que se obtiene por coagulación de la leche por medio del cuajo o por fermentación láctica.	Dependiente	Calidad
<i>Listeria monocytogenes</i>	Bacteria Gram positiva se desarrolla intracelularmente y es causante de la listeriosis.	Dependiente Cualitativo	Presencia Ausencia
Tratamiento de enriquecimiento	Uso de caldos especiales para el crecimiento selectivo de las bacterias.	Independiente Cualitativo	Presencia Ausencia
Medios de cultivo	Material alimenticio donde crecen los microorganismos.	Dependiente Cualitativo	Presencia Ausencia
Pruebas Bioquímicas	Identificación de microorganismos a través de su metabolismo.	Dependiente Cualitativo	Positivo Negativo

5.6 Muestreo

Se recolectaron 80 muestras de quesos artesanales de la zona de Huarochirí ubicada en la zona centro del Perú situada en la parte central y oriental del departamento de Lima a latitud sur 11°50'41" y latitud oeste 76°23'02".

Se obtuvieron asépticamente 80 muestras de queso fresco en distintos mercados de la provincia de Huarochirí, desde enero del 2017 hasta marzo del 2017. El muestreo fue realizado según la Norma Técnica Peruana NTP ISO 2859-1: 2009 (NTP, 2009). Cada unidad muestral estuvo constituida por 200 g de queso fresco, los que se colectaron en bolsas de polietileno estériles, rotuladas adecuadamente con plumón de tinta indeleble. Posteriormente, se colocaron las muestras en "coolers", con sus respectivos conservantes a temperatura de 0°C - 4°C; dentro de las siguientes 24 horas las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Ricardo Palma.

5.6.1 Tamaño de la muestra.

$$n = Z^2 (p.q) / T^2$$

Dónde:

Z = 1,96 (para una seguridad de 95%),

p = 0,0553 (presencia esperada, que se obtuvo del promedio de los resultados de investigaciones afines)

q = 1 - p

T = 0,05 (precisión deseada).

$$n = \frac{1.96^2 (0.0553) (0.9447)}{0.05^2} = 80.2$$

Al aplicar la fórmula al presente trabajo de investigación, se determinó que el número mínimo adecuado de muestras de queso fresco fue de 80, lo que permitió inferir los resultados hacia la población con total confiabilidad y el mínimo esfuerzo posible.

5.7 Procedimiento y análisis de datos

5.7.1 Materiales e instrumentos utilizados.

Equipos de laboratorio

- Incubadora ,30°C y 35 °C
- Balanza analítica
- Estufa
- Baño maría, 80°C +/- 2°C
- Autoclave
- Refrigerador
- Potenciómetro pH
- Micropipeta
- Pipeteador
- Microscopio
- Stomacher
- Vortex
- Contador de colonias
- Centrífuga

Materiales de vidrio

- Frascos de vidrio de 500 ml
- Matraces de 100 ml ,250 y 500 ml
- Pipetas 1ml
- Pipetas 5ml
- Pipetas 10 ml
- Probeta 500 ml
- Laminas porta objeto
- Tubos de 16 x 160 mm con tapa a rosca
- Tubos de 12 x 120 mm con tapa a rosca

Medios de cultivo

- Caldo base de enriquecimiento bufferado (BLEB)
- Acraflavina monohidroclorida
- Ácido nalidixico
- Cicloheximida
- Natamicina
- Medio Oxford
- Agar PALCAM
- Agar soya tripticasa (TSAYE) con 0.6 % de extracto de levadura
- Agar sangre de cordero
- Medio prueba de motilidad
- Caldo base de púrpura de bromocresol
- Caldo soya tripticasa (TSBYE) con 0.6 % de extracto de levadura
- Soluciones de carbohidratos conteniendo 0.5 % de dextrosa, esculina, maltosa, rhamnosa, manitol y xilosa
- Solución salina fisiológica, 0.85%
- HiListeria Kit de identificación x 20 muestras

Reactivos

- Aceite de inmersión
- Kit de tinción Gram: Cristal violeta, Lugol, safranina, alcohol acetona
- Prueba de la catalasa: Peróxido de hidrógeno

Material biológico

- *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
- *Listeria innocua* ATCC 33090
- *Listeria ivanovii* ATCC 700402
- *Rhodococcus equi* ATCC6939
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

5.7.2 Procesamiento de las muestras

El método empleado para detectar *Listeria monocytogenes* en muestras de alimentos fue basado en el Manual Analítico de Bacteriología, de la *Food and Drug Administration* (FDA). En la (Figura 2) se muestra un diagrama de flujo del procedimiento para la detección de *Listeria monocytogenes* por método FDA/BAM.

Enriquecimiento

Fueron pesados 25 g de cada muestra de queso en una bolsa de Stomacher, posteriormente fueron agregados 225 ml de caldo de caldo de enriquecimiento tamponado para *Listeria* (BLEB) y homogenizados en el stomacher por 1 a 2 minutos. Fueron incubados durante 4 h a 30°C y, por último, fueron agregados los agentes selectivos y se continuó con la incubación por 24- 48 h. (FDA/BAM Chapter 10, Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*,2002)

Aislamiento

A partir del caldo de enriquecimiento BLEB de 24 h y 48 h de incubación, se realizaron siembras en agares selectivos para aislamiento: Agar selectivo base *Listeria* (Oxford) y (Polymyxin Acriflavine Lithium chloride Ceftazidime Aesculin Mannitol.) PALCAM. Estas placas fueron incubadas a 35°C durante 24 h – 48 h. (FDA/BAM Chapter 10, Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*,2002)

Selección de colonias sospechosas

Después de la incubación fueron examinadas las placas para la determinación de la presencia de colonias típicas de *Listeria* spp. Las colonias típicas em agar Oxford son pequeñas (aproximadamente 1mm) y rodeadas por un halo de oscurecimiento debido a la hidrólisis de la esculina, en agar PALCAM las colonias típicas son de color verde oliva y están rodeadas por un halo negro. De las placas con colonias típicas fueron seleccionadas aproximadamente 5 colonias y

sembradas por estriado en agar TSA-YE, para aislamiento de las colonias sospechosas. Estas últimas placas fueron incubadas a 30°C durante 24 h – 48 h. (FDA/BAM Chapter 10, Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes*,2002)

Identificación y Bioquímica:

Prueba de la catalasa

Para la realización de esta prueba se tomaron colonias aisladas del TSA-YE y se suspendieron en una gota de solución de peróxido de hidrógeno al 3 %, en una lámina portaobjeto. La colonia aislada fue dada como positiva para esta prueba cuando se observó la formación inmediata de burbujas de gas al suspender la colonia en el peróxido de hidrógeno.

Coloración de Gram

Con el objetivo de determinar si las colonias aisladas eran Gram positivas o Gram negativas, se realizó la coloración Gram. Las colonias de *Listeria spp.* fueron observadas como bacilos Gram positivos cortos y delgados.

Inoculación en caldo TSB-YE

Las colonias típicas obtenidos de los agares Oxford y PALCAM fueron sembradas en tubos con caldo TSB-YE. Estos tubos fueron incubados a 35°C durante 24 h. A partir de este tubo se realizaron las pruebas de fermentación de hidratos de carbono y las demás pruebas bioquímicas.

Inoculación en SIM

A partir del caldo TSB-YE se inocularon unas gotas en agar SIM, y se mantuvieron en incubación a temperatura ambiente por 7 días. Las lecturas se realizaron diariamente. La placa era dada como positiva cuando se presentaba un crecimiento típico en forma de paraguas (umbrella) en la cercanía de la superficie del agar.

Prueba de fermentación de carbohidratos

A partir del cultivo obtenido en TSB-YE se inoculó con un asa cada uno de los caldos para utilización de carbohidratos: caldo base púrpura de bromocresol para fermentación de carbohidratos con 0.5 % de soluciones de dextrosa, esculina, maltosa, ramnosa, manitol y xilosa. Los caldos de carbohidratos fueron incubados a 35°C por hasta 7 días. Una reacción positiva se visualizó por una coloración amarilla, dentro de las 24-48 h. Todas las especies de *Listeria spp.* son positivas para dextrosa, esculina y maltosa; y negativas para manitol.

Prueba de CAMP

Se trazó una línea de *Staphylococcus aureus* a lo largo de la placa con agar sangre y paralelamente otra línea de *Rhodococcus equi*, separadas lo suficiente para que, entre estas, se pueda estriar transversalmente las cepas sospechosas, sin que lleguen a tocarse (aproximadamente entre 1 o 2 mm de separación) Se incubaron a 35 °C por 24 a 48 horas.

Prueba de Hemolisis

A partir del agar TSA-YE se sembró en placas de agar de sangre de carnero al 5%, se incubó por 24-48 horas y se observó el tipo de hemolisis.

Pruebas bioquímicas por kits comerciales

Los cultivos puros pudieron ser identificados por sistemas de identificación bioquímica disponibles comercialmente. En este trabajo fue utilizado el HiListeriaTM- Kit de identificación (*HiMedia Laboratories*).

Protocolo de procedimiento de laboratorio para el estudio de Listeriosis

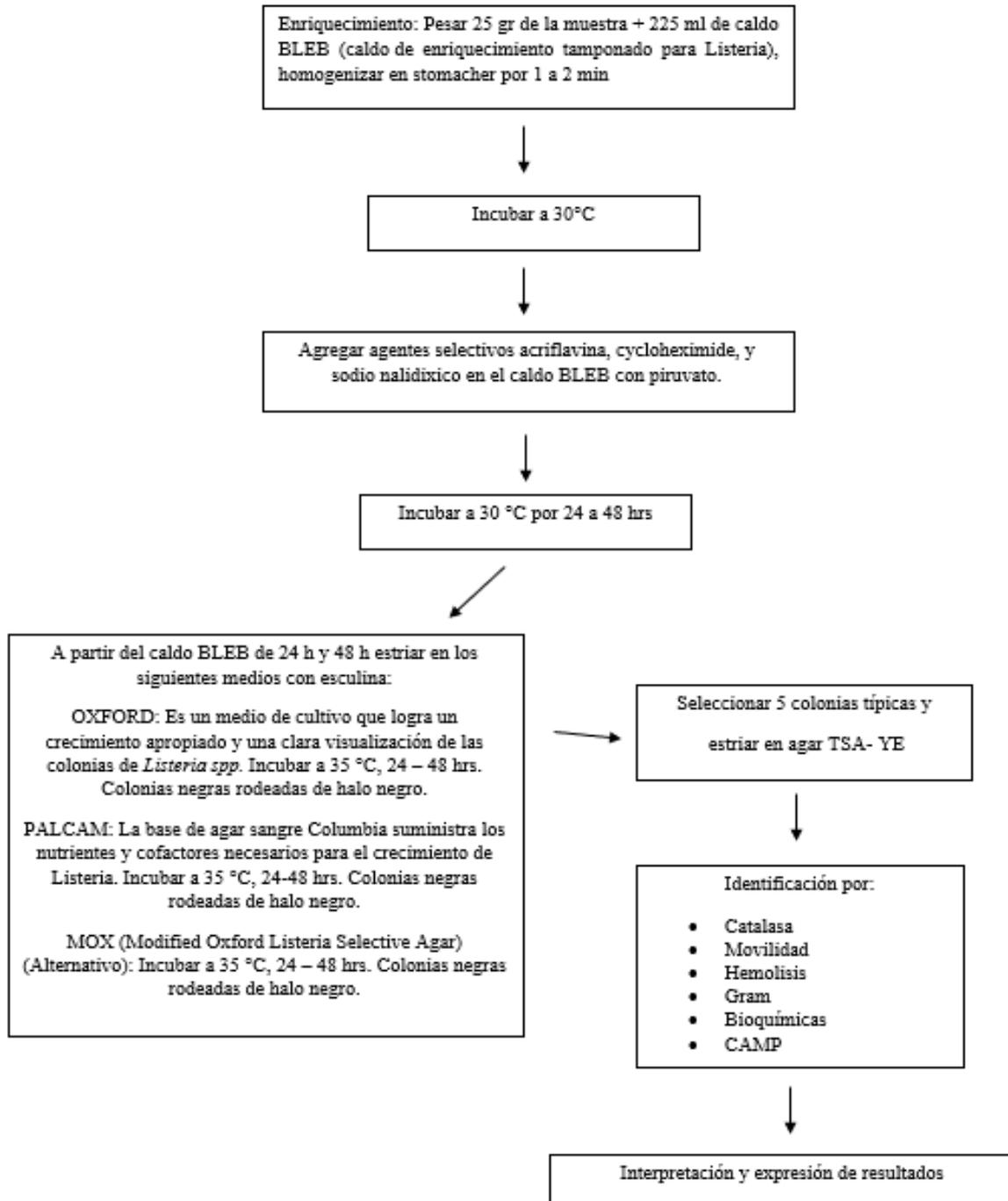


Figura 2. Diagrama de flujo del procedimiento para la detección de *Listeria monocytogenes*

Fuente: Tomado de FDA U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10.

Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods

6. Resultados

En la investigación realizada, se utilizaron 80 muestras de quesos artesanales provenientes de la provincia de Huarochirí para su respectivo análisis mediante el método FDA/BAM, lo cual fueron aisladas 32 colonias sospechosas tanto en el medio Oxford (Figura 3) como en el medio PALCAM (Figura 4).

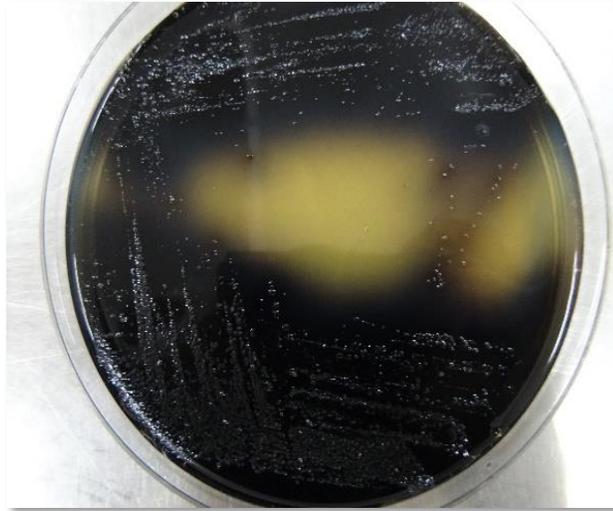


Figura 3. Placa de medio Oxford con colonias sospechosas de *Listeria spp.*

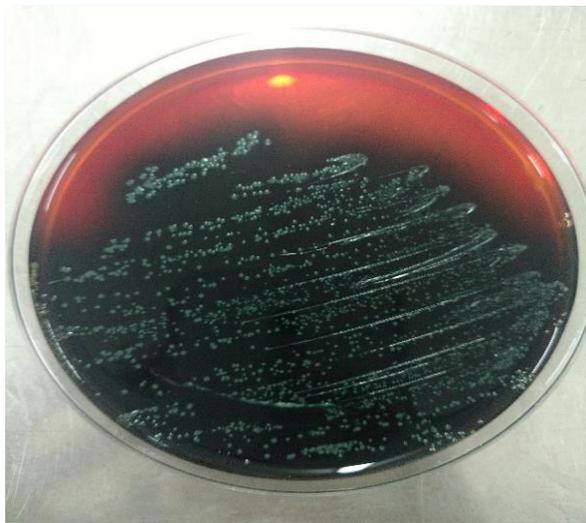


Figura 4. Placa de medio PALCAM con colonias sospechosas de *Listeria spp.*

Tabla 3.

Resultados obtenidos en aislamiento por medios selectivos.

Cantidad de muestras	Resultado
20	Positivas a <i>Listeria</i> spp
12	Positivas a Bacterias Gram positivas
48	Negativas (sin crecimiento)
80	TOTAL

Fuente: Bach.Giannina Cabanillas Torres – Universidad Ricardo Palma

Como se puede observar en la (Tabla 3), de las 80 muestras procesadas, 48 muestras dieron resultados negativos, ya que no hubo ningún tipo de crecimiento en los medios selectivos Oxford y PALCAM, las 32 muestras que tuvieron crecimiento en los respectivos medios selectivos se hicieron las correspondientes pruebas bioquímicas para identificarlas (Tabla 4). La primera prueba bioquímica realizada fue la prueba de la reacción de catalasa (Figura 13), es conocido que las bacterias del género *Listeria* spp. son catalasa positiva, de modo que la reacción negativa a esta prueba sirvió como filtro para proseguir con las demás pruebas bioquímicas. De los 32 aislados, 20 fueron positivos a la prueba de la catalasa. En las 20 muestras se realizaron las pruebas bioquímicas de β -hemólisis, prueba de CAMP, inoculación en SIM para evaluar movilidad y la prueba de fermentación de carbohidratos (ramnosa, manitol y xilosa) (Tabla 1).

Tabla 4.

Resultados de las pruebas bioquímicas realizadas en los 20 aislados catalasa positivos.

Muestras	B-hemólisis	CAMP	Movilidad (SIM) - 25°C	Fermentación de Ramnosa	Fermentación de Manitol	Fermentación de Xilosa
6	-	-	+	-	-	-
11	-	-	+	-	-	+
13	-	-	+	-	+	+
14	-	-	+	+	+	+
23	-	-	+	+	+	-
24	-	-	+	-	-	-
30	-	-	+	+	+	+
34	-	-	+	+	-	-
36	-	-	+	-	-	+
42	-	-	+	-	-	+
44	-	-	+	+	+	+
46	-	-	+	-	+	-
49	-	-	+	+	+	+
53	-	-	+	-	+	+
67	-	-	+	+	-	+
70	-	-	+	+	+	+
71	-	-	+	+	+	-
76	-	-	+	-	-	-
79	-	-	+	+	-	+
80	-	-	+	+	+	+

Fuente: Bach.Giannina Cabanillas Torres – Universidad Ricardo Palma

De la misma forma, estas 20 muestras aisladas obtenidos fueron identificados por HiListeria™-Kit de identificación (*HiMedia Laboratories*) (Figura 5). Las 20 muestras para la identificación por HiListeria KIT, antes son aislados y purificados en caldo BHI para luego incubarse a 35-37°C por 8 horas hasta que el inculo se torne turbio.

Se agregó el inculo a cada Kit para luego incubarlo por 48 horas a 37°C, hay reacciones bioquímicas del Kit que necesitan de unos reagentes para su activación. De las 20 muestras que dieron positivas a *Listeria* spp. con las pruebas bioquímicas, se pudo comprobar que ningún kit dio positivo para *Listeria monocytogenes* o *Listeria ivanovii*, que son los de importancia clínica, pero si dieron positivas para especies no patógenas del genero listeria como *Listeria innocua* y *Listeria seeligeri*.



Figura 5. Prueba HiListeria™ - Kit de identificación.

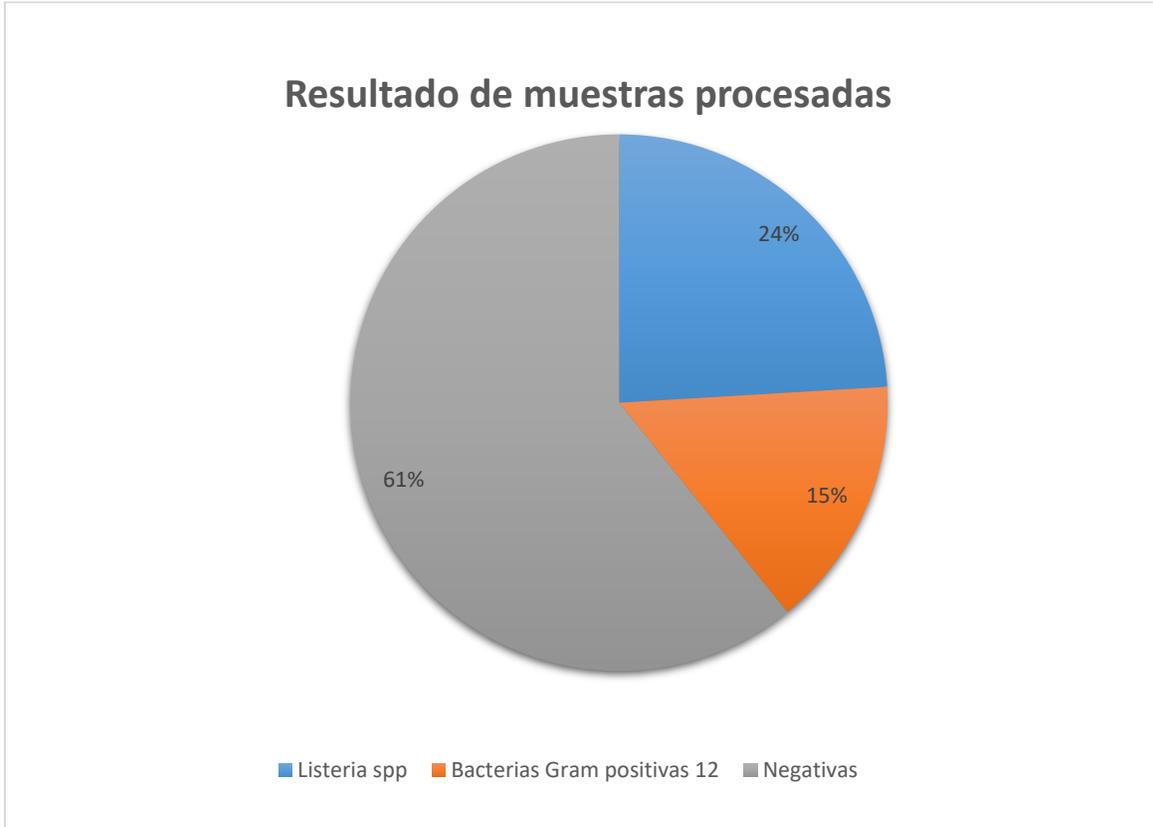


Figura 6. Resultados de las muestras procesadas de los quesos frescos.

En la (Figura 6), se puede observar el resultado en porcentaje de las muestras procesadas, siendo (24%), para *Listeria spp.*, confirmando los resultados con los halos en los medios de cultivo selectivos, la coloración Gram, las pruebas bioquímicas y con el HiListeria™ – Kit de identificación (*HiMedia Laboratories*), (15 %) para bacterias Gram positivas, confirmándolo con la observación Gram y con las respectivas pruebas bioquímicas y un (61 %) para las muestras negativas, donde no hubo ningún tipo de crecimiento. Según los resultados obtenidos, de las 80 muestras de quesos artesanales ninguna muestra fue positiva para *Listeria monocytogenes*.

7. Discusión

En el presente trabajo se buscó determinar la presencia de la bacteria *Listeria monocytogenes* en muestras de quesos frescos artesanales, provenientes y distribuidos en los mercados de Huarochirí, Lima, Perú. Los resultados obtenidos demostraron ausencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de quesos frescos artesanales de esta región de Lima.

En el Perú, la norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para alimentos y bebidas de consumo humano (NTS N° 071, 2008), establece tolerancia cero para *Listeria monocytogenes* en alimentos como quesos, embutidos, y frutas y hortalizas. De la misma forma, la tolerancia cero está establecida para alimentos listos para el consumo en el Codex Alimentarius (CAC/GL 61.2007). Lo que indica la gravedad de encontrar muestras de alimentos positivas a *Listeria monocytogenes* para la industria alimenticia.

Si bien se conoce que la pasteurización de la leche y derivados es un tratamiento efectivo contra los patógenos transmitidos por alimentos, se sabe también que los quesos son productos listos para el consumo, que no necesitan de ningún tratamiento de esterilidad antes del consumo y que son usualmente conservados en temperatura de refrigeración, la cual permite la supervivencia y crecimiento de bacterias psicotrópicas, como es el caso de *Listeria monocytogenes*. Por esta razón, la vigilancia sanitaria en estos productos debe ser inclusive más rigurosa.

(Centurión et al., 2004) obtuvo de un total de 50 muestras de carne de pollo fresco, el 2% de *Listeria monocytogenes*, en tanto que de 50 muestras de verduras resultaron un 2% positivas para la misma bacteria.

Diversos estudios han sido realizados para comprobar la inocuidad de quesos frente a *Listeria monocytogenes*. (Martino et al., 2005) determinaron una incidencia de 5,6% de *Listeria* spp. en quesos de tipo semiduros, siendo que 1,9% correspondía a *L. monocytogenes* y 3,7% correspondía a *L. innocua*. De la misma forma el grupo de (Kongo et al., 2006) examinaron 357 muestras de leche cruda y quesos colectadas de una fábrica productora de estos quesos durante un año, determinando 0.56% de prevalencia (2/357 muestras de leche) de *Listeria monocytogenes*. Otro grupo de estudio fue el de (Gallegos et al., 2007), que en su investigación en quesos colombianos costeños confirmaron contaminación por *Listeria* spp., las principales especies aisladas y confirmadas por PCR fueron *L. ivanovii* (14.75%), patógeno involucrado en algunos casos de infecciones oportunistas en humanos, y *L. innocua* (2.3%), microorganismo utilizado en muchas industrias de alimento como indicador del grado o calidad de sanitización. Estas investigaciones demostraron que las condiciones de producción y expendio de estos productos alimenticios no son adecuadas y que el consumo de quesos provenientes de estos lugares no parece ser tan seguro.

En Venezuela el grupo de (Ramírez et al., 2010) detectaron por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) una prevalencia de 6.67% (2/30) de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso blanco. Los aislados que fueron sometidos a esta técnica molecular fueron colonias que crecieron en medio PALCAM, uno de los medios utilizados en el presente estudio.

Ya en el Perú, el grupo de investigación de (Díaz-Pinillos et al., 2012) buscó determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de leche y queso fresco, en la provincia de Trujillo. Los resultados de este estudio mostraron que no hubo ninguna muestra positiva de leche a esta bacteria, sin embargo, en las muestras de queso se determinó una prevalencia de 3.34% de

Listeria monocytogenes, esos resultados a comparación de la presente investigación en donde se determina la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales de la provincia de Huarochirí, nos da como resultado ausencia para dicha bacteria, sin embargo hay una prevalencia de 24 % para *Listeria* spp., demostrando que existe un cierto riesgo sanitario en la provincia de Huarochirí, a comparación de la de Trujillo que si presente un alto riesgo sanitario para Listeriosis, ya que hay presencia de la bacteria patógena. El resultado obtenido en el presente estudio demostró que, si bien no se consiguieron aislar *Listeria monocytogenes* de las muestras de quesos, otras especies de *Listeria* spp. están presentes, demostrando inadecuadas condiciones de producción y almacenamiento de los quesos frescos artesanales de la provincia de Huarochirí.

Si bien *Listeria innocua* es una bacteria no comúnmente relacionada a casos de listeriosis humana, se han encontrado relatos en la literatura que asocian esta bacteria a casos de meningitis en pacientes inmunocomprometidos y a casos de bacteremia grave (Perrin, Bemer y Delamare, 2013) y (Favaro, Sarmati, Sancesario y Fontana, 2014), colocando una alerta al control de otras especies de *Listeria* spp. en alimentos, y no solamente a *Listeria monocytogenes*.

Los resultados del presente trabajo de investigación, demostraron que de un total de 80 muestras de quesos frescos artesanales provenientes de la provincia de Huarochirí, resultó que el 100% de las muestras eran negativas para *Listeria monocytogenes* al igual que el trabajo de investigación de (Arrese *et al.*, 2012) que analizó 51 muestras de queso dando como resultado que todas las muestras dieran negativo para *Listeria monocytogenes*, y la tesis de (García, *et al.*, 2014) donde se analizó 70 muestras de quesos dando como resultado negativo para *Listeria monocytogenes*.

Con respecto a la presencia de *Listeria* spp. en las muestras analizadas de queso fresco artesanal, el resultado fue de 20 muestras (24%) , esto puede compararse con el trabajo de (Gallegos *et al*, 2007) ya que en su trabajo de investigación denominada *Frecuencia de Listeria spp, en quesos colombianos costeños*, confirman que los quesos están frecuentemente contaminados con *Listeria spp*, A diferencia del trabajo de investigación de (Baquero *et al.*, 2006) que obtuvo como resultado en sus quesos frescos el 80% de las muestras positivas para *Listeria monocytogenes*.

8. Conclusiones

1. Se determinó la ausencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales de la provincia de Huarochirí.
2. Se determinó la presencia de *Listeria* spp. en 24% de las muestras de quesos frescos artesanales de la provincia de Huarochirí.
3. Se encontró con un total de 61% de muestras negativas (sin ningún tipo de crecimiento) en los quesos frescos artesanales analizados.
4. Se comprobó que el método FDA / BAM para la detección de *Listeria monocytogenes* resulta ser uno de los métodos más sencillos y confiables.
5. Aunque los resultados de la presencia de *Listeria Monocytogenes* resulten negativas, existen otras bacterias como las encontradas en las muestras de tipo Gram positivas que pueden resultar siendo bacterias de contaminación ambiental, contaminación cruzada u otro tipo que pueden resultar siendo patógenas o deterioradoras de los productos alimenticios.

9. Recomendaciones

1. Se recomienda que se realice más estudios en distintas regiones del Perú sobre *Listeria Monocytogenes* en quesos, ya que somos un país que consume queso en su mayoría y al ser producido de manera artesanal en distintas provincias del Perú sin tener un control de calidad idóneo, estos alimentos podrían ser una fuente de contagio alta.
2. Se recomienda la implementación de las buenas prácticas de manufactura que asegure la calidad microbiológica de los quesos frescos, haciendo un seguimiento en cada etapa de la producción asegurándonos un producto inocuo.
3. Se recomienda hacer campañas de buenas prácticas de higiene, sobre todo en los productores de quesos artesanales que encontramos en las provincias del Perú, ya que de esta manera ellos tendrán más conocimientos y cuidados en la elaboración de sus productos asegurando una mejor calidad e inocuidad de estos quesos frescos.

10. Referencias Bibliográficas

- Arrese, E., y Arroyo, M. (2012). Prevalence of listeria monocytogenes in Idiazabal cheese. *Nutr Hosp*, 27(6), 2139-2141. doi:10.3305/nh.2012.27.6.6052
- Baquero, D., Bernal, A., Campuzano, S. (2006). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de Cáqueza, Cundinamarca. *Nova - publicación científica*, 4(6), 80-83.
- Blackburn, C., y McClure, P.J. (2002). *Listeria monocytogenes* In: Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control. England: Elsevier, 337–361.
- Brock, T., Madigan, M., Martinko, J., y Parker, J.(2003). *Conservación de los alimentos y enfermedades microbianas transmitidas por alimentos. Biología de los microorganismos*. Décima edición. Madrid: Pearson. 942–56.
- Buchanan, R.L., Gorris, L.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., y Whiting, R.C.(2017) A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control*, 75, 1–13. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.12.016.
- Centurión, M., & Takajara, M. (2004). Determinación de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras frescas obtenidos en mercados y centros de abastecimiento de Lima metropolitana (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú.
- Cossart, P., y Lebreton, A.(2014) A trip in the “new Microbiology” with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *FEBS*, 588(15):2437–45. doi: 10.1016/j.febslet.2014.05.051
- Cultimed. (2002) Manual Básico de Microbiología. PANREAC QUIMICA S.A. España. 1-545.

- DGPA(Dirección general de promoción agraria).(2002). *Estudio del mercado de carne de res y productos lácteos en Lima metropolitana y Huancayo proyecto zac canipaco*. Ministerio de agricultura. Perú.
- DIGESA. (2015, abril 24). Digesa comunica no consumir helados de marca blue bell. Recuperado de: <http://www.digesa.minsa.gob.pe/noticias/Abril2015/nota22.asp>
doi: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i3.13768>
- Doyle, M., y Buchanan, R. (2013). *Food microbiology: Fundamentals and frontiers*, Fourth Edition. Washington, USA: ASM Press.
- Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., y Cossart P.(2004).Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol*, 58(1):587–610.
- Elika (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria). (2006). *Listeria monocytogenes*. Recuperado de <http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo21/Listeria.pdf>
- Ellner, R., Utzinger, D., y García, V. (1991). Aislamiento de *Listeria* sp. De diversos alimentos en Costa Rica. *Rev. Cost. Cienc. Méd*, 12 (3-4), 33–39.
- Espinoza, A., De La Torre, M., Salinas, M., y Sánchez, V. (2004). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica. *Rev. Perú med exp salud pública* 21(2), 71-75.
- Farley, M.M.(2018). *Listeria monocytogenes*. Fifth Edit. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Elsevier Inc, 781-785 p. Recuperado de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323401814001328>
- Favaro, M., Sarmati, L., Sancesario, G., y Fontana, C.(2014). Case Report First case of *Listeria innocua* meningitis in a patient on steroids and etanercept, *JMM case reports*,1–5.

- FDA-BAM. (2002). Detection of *Listeria monocytogenes* in Foods and Environmental Samples, and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Bacteriological Analytical Manual. Chapter 10. <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>
- Flores, J.G. (2012). Aislamiento y caracterización bioquímica de especies de *Listeria* sp. Obtenidas de lugares de expendio de pollo en mercados del Distrito de Trujillo, Departamento de La Libertad – Perú en los meses de Mayo – Noviembre del 2011. Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Gallegos, J., Arrieta, G., Mattar, S., Poutou, R., Alba, T., y Carrascal, A. (2007). Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. *Rev. MVZ Córdoba*, 12(2), 996-1012.
- García, M.F. (2014). Determinación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco expandido al granel en los mercados de Cuenca (tesis de magister). Universidad del Azuay. Cuenca. Ecuador.
- Gilot, P., André, P., y Content, J. (1999) *Listeria monocytogenes* possesses adhesins for fibronectin. *Infect Immun*, 67(12), 6698–701. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.micro.57.030502.090934>
- Jay, J.M. (1992). *Microbiología moderna de los alimentos*. Tercera Edición. Zaragoza, España: Acribia, 601-649.
- Julián, A., Jiménez, Á., de Górgolas, M., Fernández, R. L. y Fernández, M. (2001). Infecciones por *Listeria monocytogenes* en el adulto. Aspectos clínicos y microbiológicos de una enfermedad cambiante. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 19(7), 297–303. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X01726493>.
- Kongo, J., Malcata, X., Ho, A., y Wiedmann, M. (2006). Detection and Characterization of *Listeria monocytogenes* in Sao Jorge (Portugal) Cheese. *Production American Dairy Science Association. J. Dairy Sci*, 89, 4456–4461.

- Larraín, D., y Carvajal, J.(2008). Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de *Listeria monocytogenes* a través de la barrera placentaria. *Boletín Esc Med Chile*, 33(1):20–30.
- Liu, D. (2008). *Handbook of Listeria monocytogenes*, Taylor and Francis Group. Boca Raton: CRC Press Inc.; 297AD.
- Martino, T., Leyva, V., Pérez, A., De los reyes, M., Suarez, H., y Lara, Cesar. (2005). Determinación de listeria spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Rev. Cubana Salud Pública*,31(3),217-22.
- Mckee, F.(2016, 20 de mayo). Quesos maduros palanca de desarrollo.*Económika*.
- Melo, J., Andrew, P.W. y Faleiro, M.L.(2015). *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res Int* 67,75–90. doi: 10.1016/j.foodres.2014.10.031.
- Mirón, M., Ferrás, S., Mellado, JM., Vidal, F.,Veloso, S., y Richart, C.(2002). Coma vigil tras meningitis por *Listeria monocytogenes*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.20(3):127–128.
- Molina, N., Mercado, M., y Carrascal, A. (2009). Efecto de tiempo y temperatura de cocción en chorizo inoculados artificialmente con *Listeria monocytogenes*. *Universitas. SCIENTIARUM* 14 (2-3),198-205.
- Muñoz, A., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G., Guzmán, V.(2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y delicatessen de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomédica*,31, 428–39.
- Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G., y Pfaller, M. (2013). *Microbiología Médica*, 7ª edición, Barcelona: Elsevier Science.

- NTP- ISO 2859-1:2008 Procedimientos de muestreo para inspección por atributos. Parte 1: Esquemas de muestreo clasificados por límite de calidad aceptable (LCA) para inspección lote por lote.
- NTP-ISO 202.195:2004 Leche y productos lácteos. Queso fresco. Requisitos . Segunda edición.
- NTS N° 071-MINSA/DIGESA-V.0.(2008). Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Recuperado de: http://www.digesa.minsa.gob.pe/norma_consulta/Proy_RM615-2003.pdf
- Olivares, R.(2009).*Listeria monocytogenes*: bacteria antigua, desafío permanente. *Medwave*, 9(6) doi: 10.5867/medwave.2009.06.3994
- OMS, 2008. Manual de procedimientos aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. 1-42.
- Painter, J., Slutsker, L.(Ed.).(2007). *Listeriosis in humans. In: Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Tercera ed. Taylor and Francis, 85–109.
- Pascual, M., y Calderón, V. (2000). *Microbiología alimentaria: metodología analítica para alimentos y bebidas*. Segunda edición . Madrid: Díaz de Santos.
- Pérez, E., Chávez M, (2012) Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito, expendidos en mercados de Trujillo, Perú. *Revista Ciencia y Tecnología*, Escuela de Postgrado – UNT 8(22), 11-21
- Pérez, M., Salazar, M., y Gamarra, G. (2013) Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en salchichas tipo huacho proveniente de los mercados de abasto del cercado de Lima. *Ciencia e investigación* 16(2), 68-72.

- Pérez-Rubiano, C., Mercado-Reyes, M., y Carrascal-Camacho, A.K.(2008). Incidencia de *Listeria spp* . en carcasas de pollo congelado en un supermercado del nororiente de Bogotá. *Nova*, 6(10),141–146.
- Perlera, A.E. (2015). Determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco artesanal producido en el departamento de Cabañas, Producción Agropecuaria y Desarrollo sostenible, 4, 89-106.
- Perrin, M., Bemer, M., y Delamare, C.(2003). Fatal Case of *Listeria innocua* Bacteremia. *J Clin Microbiol*,41(11),5308–9.
- Pinillos, M., Chávez, M., Saucedo, E. (2012). *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la Provincia de Trujillo, Perú. *Revista “Ciencia y Tecnología”, Escuela de Postgrado – UNT.*
- Piskulich, R.(2001). Mercado peruano de Lacteos. *Rev Inv Vet*, 12(2), p. 29-32.
- Ramírez, L., Morón, A., Alfieri, A., y Gamboa, O. (2010). Detección de *Listeria monocytogenes* en queso blanco criollo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* ,60 (3), 254-260.
- RENALOA (Red nacional de laboratorios oficiales de análisis de alimentos). (2011). Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. Microorganismos patógenos. Ministerio de salud Vol. 1, 1-173.
- Rocourt, J., y Buchrieser, C.(Ed.).(2007).The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Tercera edicion. Taylor and Francis .

- Rodríguez, E., Chávez, M. (2011). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito, expendidos en mercados de Trujillo, Perú. *Revista “Ciencia y Tecnología”, Escuela de Postgrado – UNT.*
- Ryser, E., y Donnelly, C. (2015) *Compendium of methods for the microbiological examinations of foods*, fifth edition. Washington, USA: APHA, Chapter 35, Listeria, 425-440.
- Saldivar, J.C. Davis, M.L. Johnson, M.G. y Ricke, S.C.(2017) Listeria monocytogenes Adaptation and Growth at Low Temperatures: Mechanisms and Implications for Foodborne Disease. doi : 10.1016/B978-0-12-811835-1.00013-0
- Segura, R., y Chávez, M. (2013). Riesgo alimentario de *Listeria monocytogenes*, en ensalada de frutas y yogurt natural, en la transmisión de listeriosis humana. *Pueblo cont*,25(1),157-62.
- Swaminathan, B., y Gerner-Smidt. P.(2007)The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect*, 9(10),1236–43.
- Tolentino, J.C.(2014). Aislamiento de Listeria spp. de superficies donde se expende Merluccius gayi peruanus “Merluza”, en el mercado modelo de la ciudad de Paita - Piura, en los meses Junio - Noviembre 2013(tesis de grado). Universidad Nacional de Trujillo, Perú.
- Torres, K., Sierra, S., Carrascal, A., Mercado, M.(2005). Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. *MVZ-Córdoba*,10(1),511–543.
- Välilä, A.L., Tilsala-Timisjärvi, A., y Virtanen, E.(2015). Rapid detection and identification methods for *Listeria monocytogenes* in the food chain - A review. *Food Control*,55,103–14.
- Villanueva, D., Salazar, M. (2017). Formación de biopelículas por *Listeria monocytogenes* aisladas de queso fresco de mercados del Cercado de Lima. *An Fac med*,78(3),322-325.

11. ANEXOS

Anexo 1. Caldo de enriquecimiento buffer *Listeria* (BLEB)

Medio base

Ingredientes:

Caldo tripteína soja	30 g
Extracto de levadura	6 g
Fosfato monopotásico.....	1.35g
Fosfato disódico.....	9.6g
Piruvato de sodio.....	1.11g
Agua destilada	1000 ml

Preparación: Agregar los componentes deshidratados al agua destilada y calentar suavemente hasta su completa disolución. Ajustar pH \pm 7,3. Esterilizar 15 minutos a 121 °C. 3.2

Suplemento 1

Ingredientes:

Acriflavina HCl	23 mg
Agua destilada.....	10 ml

Preparación: Disolver acriflavina HCl en agua destilada. Esterilizar por filtración.

Suplemento 2

Ingredientes:

Ácido nalidíxico (sal sódica)	46 mg
Solución de NaOH 0.05 M	10 ml 3.3.2

Preparación:

Disolver el ácido nalidíxico en la solución de NaOH 0.05 M. Esterilizar por filtración. 3.4

Suplemento 3

Ingredientes:

Cicloheximida	57.5 mg
Etanol 96% v/v	4 ml
Agua destilada	6 ml

Preparación: Disolver la cicloheximida en mezcla etanol / agua. Esterilizar por filtración.

Preparación del medio completo La base y los suplementos deben ser guardados separadamente, protegidos de la luz y refrigerados entre 2 y 5 °C.

Para completar la preparación del medio, agregar a 225 ml del medio base:

Suplemento 1 = 1 ml

Suplemento 2 = 2 ml

Suplemento 3 = 2 ml

Fuente: Manuel de *Listeria monocytogenes*

ANEXO 2

Listeria según Oxford, Base de Agar

Medio selectivo para la detección de *Listeria monocytogenes*

Fundamento:

Formulación descrita por Curtis y col. Se recomienda para la detección de *Listeria monocytogenes* en diversas muestras.

El cloruro de litio, acriflavina, colistina, cicloheximida, cefotetan y fosfomicina son los agentes inhibidores de la flora

acompañante. Además, el medio incorpora esculina para detectar la capacidad hidrolítica, rasgo característico de todas las especies de *Listeria*. La hidrólisis transforma la esculina en esculetina. Esta esculetina genera un complejo de color negro al reaccionar con los iones de hierro presentes en la fórmula, que se hace visible al producirse un oscurecimiento del medio inoculado con muestras presuntamente positivas una vez producida la incubación.

Fórmula (por litro):

Columbia, Base de Agar.....	39,0
Esculina.....	1,0
Amonio Hierro (III) Citrato.....	0,5
Litio Cloruro	15,0
pH: 7,2±0,2	

Procedimiento:

Suspender 27,8 g en 500 ml de agua destilada, calentar y agitar hasta ebullición y disolución total. Hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C. Añadir, asépticamente, un vial de *Listeria*, Suplemento selectivo según Oxford reconstituido en 2,0 ml de agua destilada.

Suplemento selectivo Oxford

Fundamento Liofilizado de cuatro antibióticos y un colorante que inhiben el crecimiento de la flora acompañante en cultivos de *Listeria monocytogenes*.

Fórmula (por litro) Composición (mg/vial):

Cicloheximida	200,0
Colistina Sulfato	10,0
Acriflavina.....	2,5
Cefotetan	1,0
Fosfomicina.....	5,0

Fuente: Manual básico de microbiología CULTIMED

ANEXO 3

Listeria PALCAM, Base de Agar

Medio para el aislamiento selectivo, cultivo y diferenciación de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en alimentos

Fundamento

Los nutrientes de este medio permiten un buen crecimiento de *Listeria*. La Polimixina B, la Acriflavina, el Cloruro de litio y la Ceftazidima son inhibidores de la flora acompañante. *Listeria* hidroliza la esculina obteniéndose glucosa y esculina, ésta al combinarse con iones de hierro da un producto de color verde oliva negro. Este complejo hace que en caso de crecimiento de *Listeria* en el caldo PALCAM, éste pase de su color rojizo a un color pardo negruzco, mientras que las colonias de *Listeria* que crezcan en el Agar PALCAM presentan el color del complejo (verde oliva negro). Las bacterias manitol positivas que no hayan sido inhibidas en este medio formarán colonias de color amarillo.

Fórmula (por litro)

Columbia, Base de Agar.....	39,0
Extracto de Levadura	3,0
Glucosa.....	0,5
Esculina	0,8
Amonio Hierro (III) Citrato.....	0,5
Manita.....	10,0
Rojo de Fenol	0,08
Cloruro.....	15,0
pH: 7,2±0,2	

Procedimiento

Suspender 34,5 g en 500 ml de agua destilada, calentar y agitar hasta ebullición y disolución total. Hervir durante 1 minuto. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 45-50°C y añadir un vial de *Listeria*, Suplemento selectivo PALCAM reconstituido en 2,0 ml de agua destilada estéril.

Suplemento selectivo Palcam

Fundamento Liofilizado de dos antibióticos y un colorante que inhiben el crecimiento de la flora acompañante en cultivos de *Listeria monocytogenes*. Fórmula (por litro) Composición (mg/vial):

Polimixina B Sulfato.....	5,0
Ceftacina.....	10,0
Acriflavina.....	2,5

Fuente: Manual básico de microbiología CULTIMED

ANEXO 4



*Figura 7.*Muestras de quesos para su respectivo análisis



*Figura 8.*Caldos BLEB para ser añadidos a las muestras de quesos.



Figura 9. Incubadora con muestras de quesos ya preparados con los caldos de enriquecimiento.

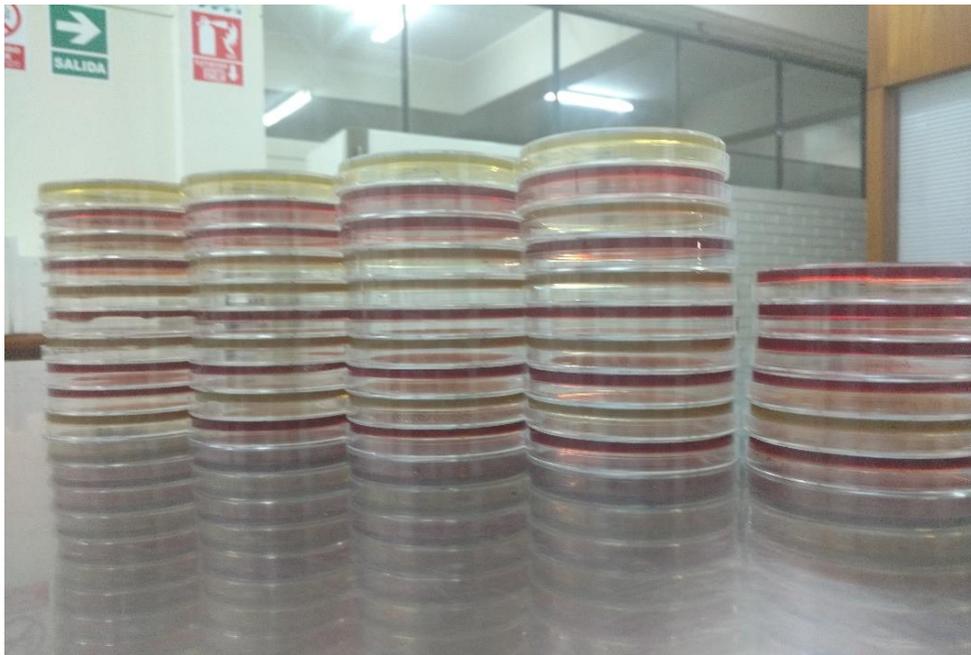
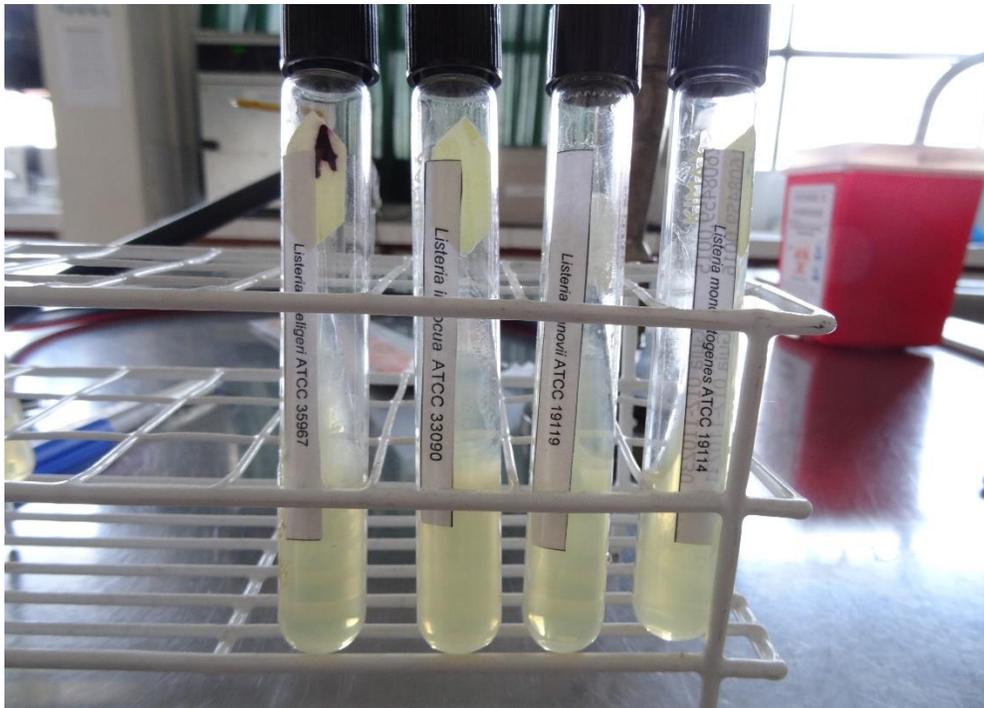


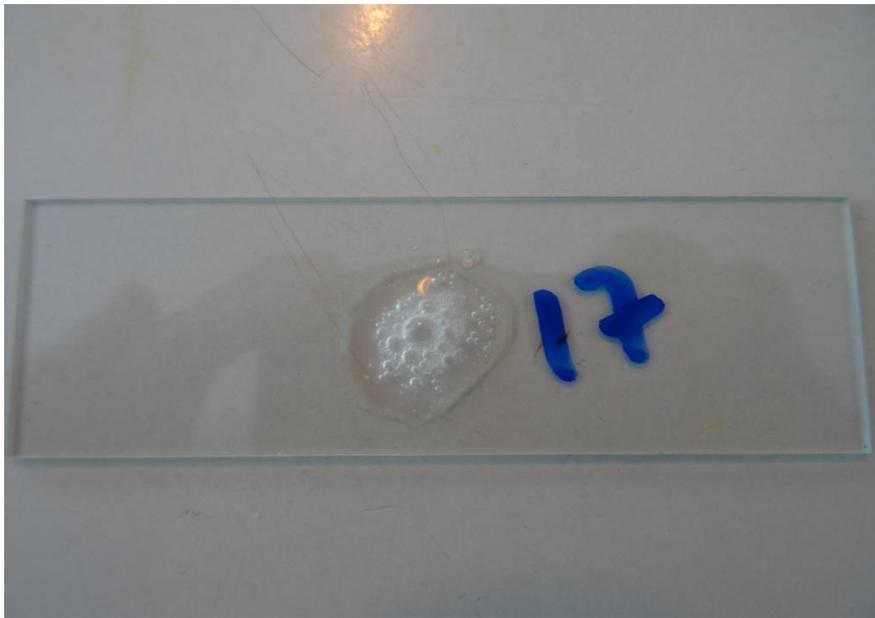
Figura 10. Lectura de Placas a las 48 horas.



*Figura 11.*Cepario utilizado para los análisis de las muestras.



*Figura 12.*Venta de quesos frescos artesanales en mercado de Huarochirí.



*Figura 13.*Reaccion de catalasa positivo de muestra.



*Figura 14.*Prueba de motilidad.

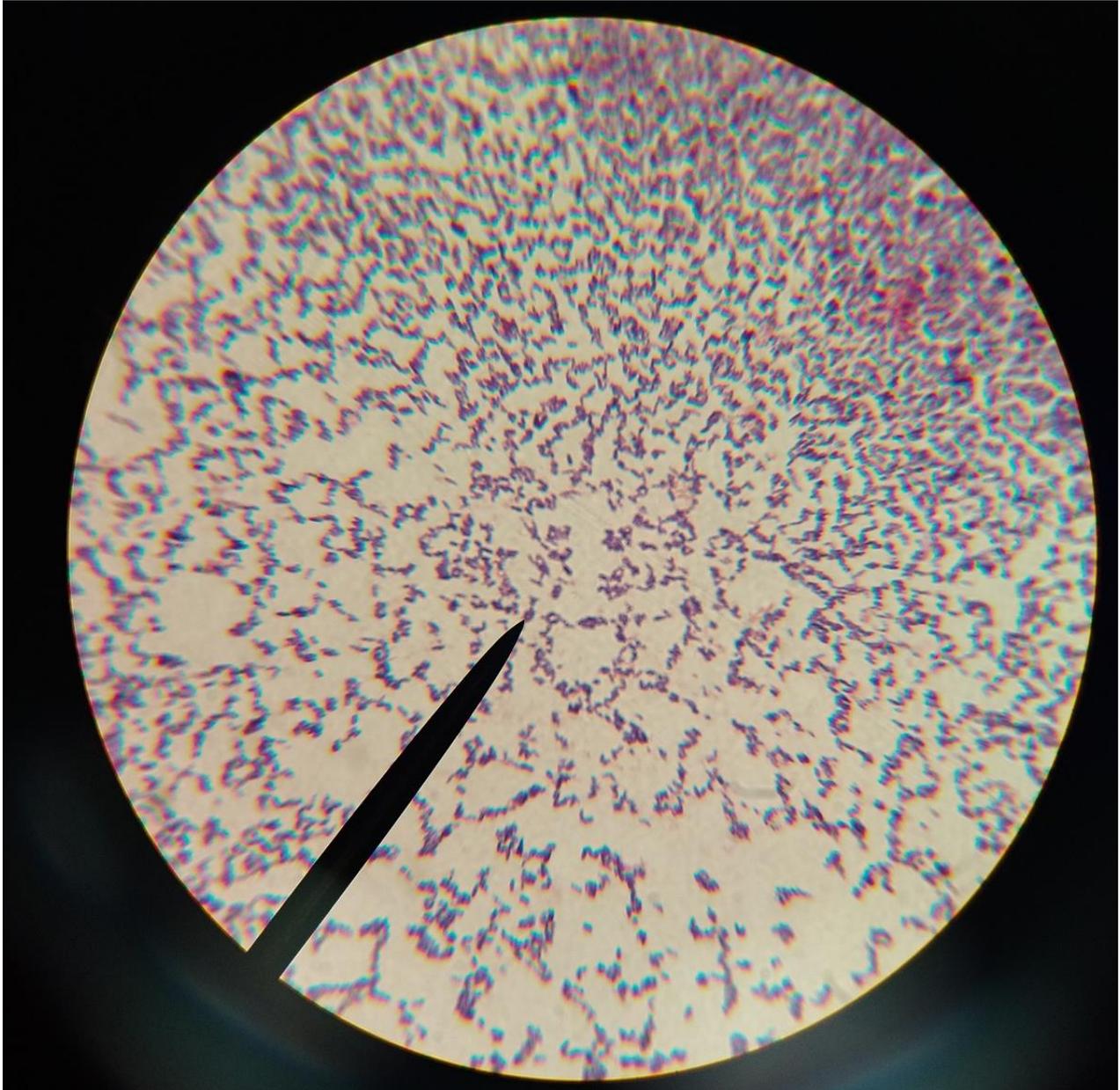


Figura 15. Observación de bacilos Gram positivos en coloración Gram.

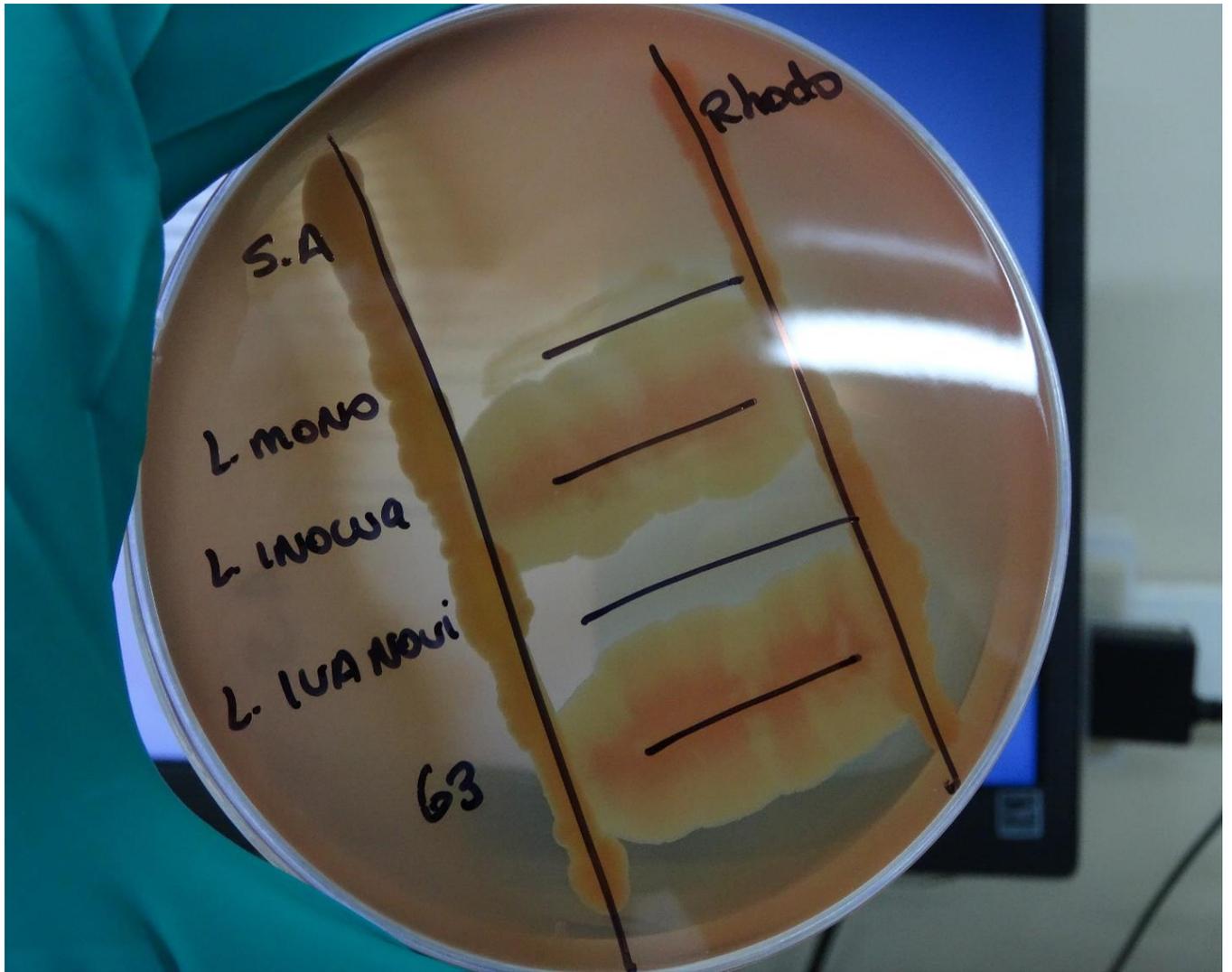


Figura 16. Prueba de CAMP negativo.

ANEXO 5

Participantes	Número de colegiatura
1. Blgo. Pablo Sánchez Rodríguez	CBP:7905
2. Blgo. Marysabel Salas Sierralta	CBP:11676
3. Blgo. Manuel Pineda Bazán	CBP:11148
4. Blgo. Liz Gómez Briceño	CBP:9921
5. Blgo. Cynthia Blas Paredes	CBP:10847

ANEXO 6

Facultad de Ciencias Biológicas

Universidad Ricardo Palma

Cuestionario

El presente estudio tiene como objetivo determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales de la provincia de Huarochirí. La metodología utilizada para determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* es la establecida por la administración de alimentos y medicamentos (FDA/BAM), así podremos confirmar si los quesos que se venden en Huarochirí son aptos para la comercialización a la población.

Instrucciones:

Estimados encuestados, la presente investigación necesita de su colaboración con respecto al tema. Agradecemos anticipadamente su participación respondiendo con un aspa lo que considere correcto si tiene alguna observación, considerar responderla.

1. ¿Considera Usted correcto el estudio de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de Huarochirí?

SI

NO

Observación:

2. ¿Los objetivos tanto generales como específicos muestran mi alcance de estudio en dicha investigación y los pasos a realizar para determinarlo?

SI

NO

Observación:

3. ¿El planteamiento del problema nos muestra la problemática que abarca el estudio a investigarse y sus respectivas soluciones?

SI

NO

Observación:

4. ¿Considera a la Listeriosis como un problema de salud público en el Perú por lo tanto debe ser tratada como objeto de estudio en esta investigación?

SI

NO

Observación:

5. ¿Los quesos artesanales al no cumplir con las normas sanitarias para su producción deben de servir como objeto de estudio en esta investigación para un mayor control?

SI

NO

Observación:

6. ¿Considera correcto el uso del ensayo microbiológico FDA/BAM para la detección de *Listeria monocytogenes* que quesos frescos de Huarochirí?

SI

NO

Observación:

7. ¿Considera que el uso del caldo selectivo BLEB para el crecimiento de *Listeria monocytogenes* es el indicado?

SI

NO

Observación:

8. ¿Las pruebas bioquímicas ayudaran en esta investigación al adecuado reconocimiento de los diferentes tipos de *Listeria* y así poder diferenciar *Listeria monocytogenes* de *Listeria spp*?

SI

NO

Observación:

9. ¿Considera que el uso de kit comerciales para la detección de listeria en esta investigación sea un método confiable?

SI

NO

Observación:

10. ¿Esta investigación lo considera de tipo relevante?

SI

NO

Observación:

NOMBRE:

CBP:

FIRMA:

ANEXO 7

PREGUNTA	JUECES						TPTAL
	1	2	3	4	5		
1	1	1	1	1	1		5
2	1	1	1	1	1		5
3	1	1	1	1	1		5
4	1	1	1	1	1		5
5	1	1	1	1	1		5
6	1	1	1	1	1		5
7	1	1	1	1	1		5
8	1	1	1	1	1		5
9	1	1	1	1	1		5
10	1	1	1	1	1		5
TOTAL	10	10	10	10	10		50

1	SI
2	NO

$$B = T_a / T_a + T_o$$

$$B = (50 / 50 + 0)$$

$$B = 50 / 50$$

$$B = 1 = 100 \%$$

≤ 0.65 MALO

0.66 - 0.71 REGULAR

0.72 - 0.99 BUENO

1.00 MUY BUENO

Interpretación:

El resultado 1 o 100 % cae entre el parámetro de bueno que es un resultado aceptable de la validación del estudio, como resultado de confiabilidad del instrumento.