



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
"PEDRO RUIZ GALLO"**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y  
PARASITOLOGÍA**

**Efecto de bajas temperaturas y tiempo en el  
control de *Listeria monocytogenes* inoculada  
en leche pasteurizada.**

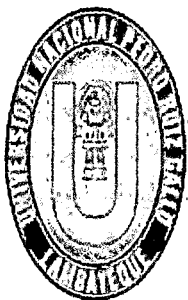
# **TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. ANDREA MILUSKA FLORES CABRERA**

**LAMBAYEQUE - PERÚ  
2015**



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
PEDRO RUIZ GALLO**



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y  
PARASITOLOGÍA**

**Efecto de bajas temperaturas y tiempo en el  
control de *Listeria monocytogenes* inoculada  
en leche pasteurizada.**

# **TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Br. ANDREA MILUSKA FLORES CABRERA**

**LAMBAYEQUE - PERÚ  
2015**

**Efecto de bajas temperaturas y tiempo en el control de  
*Listeria monocytogenes* inoculada en leche  
pasteurizada**

**TESIS**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN  
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA**

**APROBADO POR:**

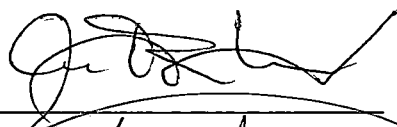
**Dra. Gianina LLontop Barandiarán**

**PRESIDENTE**



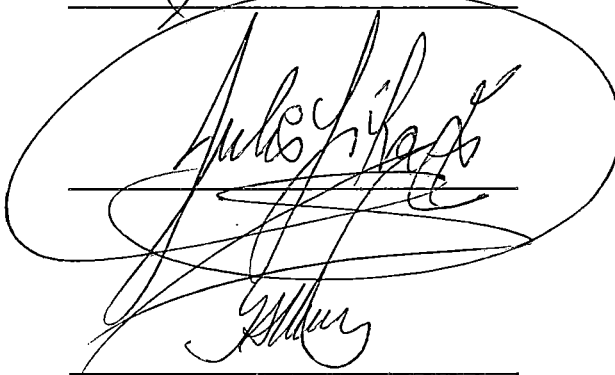
**Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán**

**SECRETARIA**



**Lic. Julio César Silva Estela**

**VOCAL**



**Dra. Graciela Olga Albino Cornejo**

**PATROCINADORA**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2015**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar a Dios por permitirme la culminación de esta etapa de realización profesional, nada hubiera sido posible sin él y las fuerzas que me brinda día con día.

A mi padre, José Edgardo Flores Silva, quien nunca dejó de creer en mí y de apoyarme a lo largo de mi carrera, gracias por siempre sentirte orgulloso de mis logros.

A mi madre, Ana María Cabrera Campos, sus palabras de aliento y permanente preocupación por mi bienestar fueron cruciales para la finalización de mi tesis, gracias por todo lo que haces por mí.

A mis hermanos, Diana, Irving y Olenka, con quienes he compartido muchos momentos de alegría a pesar de las adversidades y son mi motivación para salir adelante.

A mi asesora, Dra. Graciela Albino Cornejo, gracias por su interés en mi investigación y bienestar personal; además del gran ejemplo de persona que me ha brindado, me siento honrada por toda la confianza recibida y espero los resultados obtenidos sean muy satisfactorios para usted.

A la colaboración de Lic. Liliana Díaz, por su ayuda desinteresada en la obtención de la cepa necesaria para iniciar el presente trabajo y; a Dra. Sully Montenegro, por brindarme su tiempo y medios de cultivo para la preservación de la cepa, de igual manera su interés por mi estudio.

A el apoyo constante de Michael Casos Dávila, quien siempre estuvo a mi lado con palabras de aliento, amor y comprensión, su compañía y colaboración en la ejecución de mi tesis fueron muy significativas, gracias por todo.

A mis grandes amigos, Hernán Callirgos y Luis Jiménez, quienes nunca me han permitido estar triste y me han acompañado en todo el desarrollo de mi tesis.

A mi mejor amiga, Jadit Rueda Gutiérrez, quien me impulsa a soñar en grande y siempre se ha dado tiempo para nuestra amistad a pesar de la distancia.

A mis amigos del código 2009-I, con quienes siempre nos hemos ayudado mutuamente, gracias por su amistad acompañada con muchos chistes y risas inclusive en los momentos de estrés, especialmente para: Eveling, Flor, Víctor Hugo, Robert, Natali, Anselmo, Henry, Milena, Charly, Juan Diego, Jorge T. y Jorge C.

## **Dedicatoria**

*En el camino de la vida hay muchas personas que se preocupan por ti y siempre están presentes de una u otra manera para ayudarte en los buenos y malos momentos. "¡Tú puedes!" es una expresión que me han dicho todas las personas a quienes dedico este presente estudio, espero sea de su conocimiento lo mucho que los valoro y aprecio:*

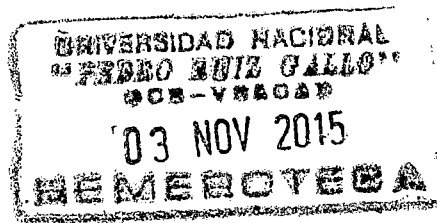
*A Dios, quien nunca me ha desamparado y he sentido que con cada oración me escuchaba paciente dándome tranquilidad y confianza en mí misma.*

*A mi padre, José, quien tal vez desconoce que siempre ha sido un ejemplo de superación para mí y a pesar de todos nuestros malos entendidos nunca he dejado de sentirme orgullosa de ser su hija.*

*A mi madre, Ana, quien en su momento me ha acompañado en innumerables amanecidas de estudio, me ha alentado a que nunca abandone mis sueños y que los malos momentos son pasajeros, eres una de mis inspiraciones para avanzar.*

*A mis hermanos, Diana, Irving y Olenka, quienes entienden mejor que nadie el esfuerzo que amerita dedicarse a desarrollar un buen trabajo, aprendo tanto de ustedes es por ello que confío que tendrán un futuro prometedor.*

*A mis familiares, quienes nunca han dudado de mí y mis deseos de superación tanto profesional como personal.*



## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	4
2.1 Efecto de bajas temperaturas y tiempo en el control de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	5
2.2 La leche.....	10
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1 Materiales.....	12
3.1.1 Material biológico.....	12
3.1.2 Población y muestra de estudio.....	12
3.2 Métodos.....	12
3.2.1 Variables de estudio.....	12
3.2.2 Tipo de estudio y Diseño de contratación de hipótesis.....	13
3.2.3 Aislamiento e Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
3.2.4 Multiplicación de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
3.2.5 Preparación del inóculo e Inoculación en el producto.....	19
3.2.6 Exposición de la muestra a temperaturas bajas y a diferentes tiempos .....	24
3.2.7 Control de la acción de las temperaturas bajas considerando el tiempo de exposición.....	26
3.2.8 Análisis de datos .....	31
IV. RESULTADOS .....	32
4.1 <i>Listeria monocytogenes</i> , aislamiento e identificación .....	32
4.2 Multiplicación de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	33
4.3 Efecto del tiempo y las bajas temperaturas en <i>Listeria monocytogenes</i> .....	33
V. DISCUSIÓN.....	55
VI. CONCLUSIONES .....	62
VII. RECOMENDACIONES.....	63
VIII. RESUMEN.....	64
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
X. ANEXOS.....	72

ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Promedio de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición. ....	43
<b>Tabla 2.</b>	Promedio de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -5°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición. ....	43
<b>Tabla 3.</b>	Promedio de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 0°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición. ....	44
<b>Tabla 4.</b>	Promedio de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 5°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición. ....	44
<b>Tabla 5.</b>	Promedio de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición. ....	45
<b>Tabla 6.</b>	Rango de crecimiento en UFC de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0, 5 y 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición. ....	49
<b>Tabla 7.</b>	Número de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0, 5 y 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición y una dilución representativa. ....	51
<b>Tabla 8.</b>	Número de reducción de ciclos logarítmicos de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0, 5 y 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición y una dilución representativa. ....	51
<b>Tabla 9.</b>	Tiempo de reducción decimal (D) de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0, 5 y 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición y una dilución representativa. ....	53

**Tabla 10.** Porcentaje de reducción decimal para el valor D y el tiempo de exposición establecido de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10 y -5°C, teniendo en cuenta una dilución representativa. .... 53



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Cepa de <i>L. monocytogenes</i> proporcionada por la Gerencia Regional de Salud – Sede Lima.....	14
<b>Figura 2.</b>	Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en Agar Tripticasa Soya suplementado con Glucosa.....	14
<b>Figura 3.</b>	Leche pasteurizada presentada en caja marca Gloria.....	15
<b>Figura 4.</b>	Siembra de <i>L. monocytogenes</i> en Caldo de enriquecimiento según Fraser.....	15
<b>Figura 5.</b>	Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en Caldo de enriquecimiento según Fraser incubado a 37°C durante 24 horas.....	16
<b>Figura 6.</b>	Placas servidas con Agar Oxford.....	17
<b>Figura 7.</b>	Siembra de <i>L. monocytogenes</i> en placa con Agar Oxford.....	17
<b>Figura 8.</b>	Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en placa con Agar Oxford.....	18
<b>Figura 9.</b>	Colonias de <i>L. monocytogenes</i> en placa con Agar Oxford.....	18
<b>Figura 10.</b>	Extracción de 1mL del cultivo joven de <i>L. monocytogenes</i> .....	20
<b>Figura 11.</b>	Diluciones seriadas del inóculo de <i>L. monocytogenes</i> desde 10 <sup>-1</sup> hasta 10 <sup>-6</sup> .....	20
<b>Figura 12.</b>	Llenado de los frascos con 100mL de leche pasteurizada.....	21
<b>Figura 13.</b>	Extracción de 1mL del inóculo de <i>L. monocytogenes</i> a 10 <sup>-6</sup> UFC/mL.....	21
<b>Figura 14.</b>	Inoculación de <i>L. monocytogenes</i> a 10 <sup>-6</sup> UFC/mL en leche pasteurizada.....	22
<b>Figura 15.</b>	Frascos inoculados con <i>L. monocytogenes</i> .....	22
<b>Figura 16.</b>	Crecimiento bacteriano de leche pasteurizada en Agar Mc. Conkey incubada a 37°C durante 24 horas.....	23
<b>Figura 17.</b>	Crecimiento bacteriano de leche pasteurizada en Agar Nutritivo incubada a 37°C durante 24 horas.....	23
<b>Figura 18.</b>	Termómetro para bajas temperaturas de -40°C a 40°C.....	24
<b>Figura 19.</b>	Exposición a bajas temperaturas de los frascos inoculados con <i>L. monocytogenes</i> .....	25

<b>Figura 20.</b>	Diluciones seriadas de leche pasteurizada inoculada con <i>L. monocytogenes</i> desde $10^{-1}$ hasta $10^{-6}$ .....	28
<b>Figura 21.</b>	Extracción de 1mL de un frasco con leche pasteurizada inoculado con <i>L. monocytogenes</i> . ....	28
<b>Figura 22.</b>	Siembra de 1mL de las diluciones de leche pasteurizada inoculada con <i>L. monocytogenes</i> desde $10^{-1}$ hasta $10^{-6}$ . ....	29
<b>Figura 23.</b>	Placas sembradas por profundidad para cada dilución preparada con su respectivo duplicado. ....	29
<b>Figura 24.</b>	Incubación de las placas sembradas por profundidad a 37°C durante 24 horas.....	30
<b>Figura 25.</b>	Lectura de las placas sembradas por profundidad después de 24 horas incubadas a 37°C. ....	30
<b>Figura 26.</b>	Tinción GRAM de la cepa de <i>L. monocytogenes</i> . ....	34
<b>Figura 27.</b>	Prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson (CAMP) realizada a la cepa de <i>L. monocytogenes</i> .....	34
<b>Figura 28.</b>	Crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en Agar Sangre incubado a 37°C durante 24 horas. ....	35
<b>Figura 29.</b>	Visualización de las colonias de <i>L. monocytogenes</i> en Agar Oxford. ....	35
<b>Figura 30.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-1}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a -5°C durante 24 horas. ....	36
<b>Figura 31.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-2}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a -5°C durante 24 horas. ....	36
<b>Figura 32.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-3}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a -5°C durante 24 horas. ....	37
<b>Figura 33.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-1}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a -5°C durante 48 horas. ....	37
<b>Figura 34.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-1}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a -5°C durante 72 horas. ....	38
<b>Figura 35.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-1}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a -5°C durante 96 horas. ....	38

<b>Figura 36.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-1}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a 10°C durante 24 horas. ....	39
<b>Figura 37.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-2}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a 10°C durante 24 horas. ....	39
<b>Figura 38.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-3}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a 10°C durante 24 horas. ....	40
<b>Figura 39.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-4}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a 10°C durante 24 horas. ....	40
<b>Figura 40.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-5}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a 10°C durante 24 horas. ....	41
<b>Figura 41.</b>	Crecimiento de la dilución $10^{-6}$ de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a 10°C durante 24 horas. ....	41
<b>Figura 42.</b>	Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -10°C durante un tiempo determinado. ....	46
<b>Figura 43.</b>	Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -5°C durante un tiempo determinado. ....	46
<b>Figura 44.</b>	Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 0°C durante un tiempo determinado. ....	47
<b>Figura 45.</b>	Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 5°C durante un tiempo determinado. ....	47
<b>Figura 46.</b>	Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 10°C durante un tiempo determinado. ....	48
<b>Figura 47.</b>	Curva de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> según el número de reducción de ciclos logarítmicos, inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0 y 5°C durante un tiempo determinado. ....	52

**Figura 48.** Curva de muerte de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10 y -5°C, teniendo en cuenta el valor D-10 y D-5, el tiempo de exposición y una dilución representativa. .... 54

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b>	Características morfológicas y algunas propiedades de <i>L. monocytogenes</i> según el estudio .....	73
<b>Anexo 2.</b>	Factores que impactan en el crecimiento y la supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> (En AESAN, 2011) .....	73
<b>Anexo 3.</b>	Concentraciones aproximadas de algunos componentes nutritivos de la leche (En Doyle, 2001) .....	74
<b>Anexo 4.</b>	Medio Base Oxford (En Difco, 2003) .....	75
<b>Anexo 5.</b>	Caldo de enriquecimiento selectivo para <i>Listeria</i> (base) según FRASER (En Merck, 2013) .....	76
<b>Anexo 6.</b>	Valores de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición .....	77
<b>Anexo 7.</b>	Valores de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 5°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición .....	78
<b>Anexo 8.</b>	Valores de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 0°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición .....	79
<b>Anexo 9.</b>	Valores de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -5°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición .....	80
<b>Anexo 10.</b>	Valores de UFC/mL de <i>L. monocytogenes</i> inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición .....	81
<b>Anexo 11.</b>	Análisis estadístico: Análisis de la Varianza (ANOVA).....	82

## I. INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* es un bacilo grampositivo, pequeño de 0,4-0,5 x 0,5-2  $\mu\text{m}$ ; anaerobio facultativo; crece entre 0-50°C, con una temperatura óptima entre 30-37°C; móvil (peritríco) en medios líquidos a 20-25°C, pero inmóvil a 37°C; criotolerante; catalasa positivo; oxidasa negativo; no posee cápsula; no forma espora y en placas de agar sangre produce hemólisis (Murray *et al.*, 2006; Jawetz *et al.*, 2005; García-Rodríguez & Picazo, 2000). Según el antígeno somático (O) y el flagelar (H) existen 13 serotipos en que se clasifica *L. monocytogenes*, y de estos tan solo tres (1/2 a, 1/2 b y 4 b) representan el 89-96% de casos de listeriosis en todo el mundo. (López *et al.*, 2006)

Dicho microorganismo presenta una amplia distribución en el ambiente; se ha aislado a partir de diversas fuentes incluyendo suelo, vegetación, ensilaje, agua, aguas residuales (FAO/OMS, 2000), heces de muchos animales e incluso de heces de personas. (Frazier, 1993). Los bóvidos infectados con *L. monocytogenes* eliminan al microorganismo en la leche; otros animales infectados, entre los que se incluyen los óvidos y las gallinas, pueden actuar como transmisores del microorganismo a los alimentos.

*L. monocytogenes* muestra resistencia a condiciones ambientales adversas tales como pH bajo, concentraciones elevadas de NaCl y temperaturas muy bajas, creciendo a 4-8°C inclusive a -1,5°C con un crecimiento muy lento y con un período de latencia muy largo de 174 horas (Lundén, 2004), lo que incrementa las posibilidades de infección, aun cuando los alimentos se conserven en refrigeración (2-4°C); asimismo tratamientos insatisfactorios de pasteurización pueden constituirse en una seria amenaza para la seguridad en la industria alimentaria. (Brackett, 1988)

La listeriosis se presenta con frecuencia en mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos, pacientes con enfermedades neoplásicas, personas que tienen el sistema inmunitario deficiente, pacientes con tumores malignos tratados con corticoides y aquellos infectados por VIH. También produce enfermedades invasivas y no invasivas como infecciones en el embarazo, granulomatosis antiséptica, sepsis de origen desconocido, meningoencefalitis, infecciones focales y gastroenteritis que ocurren en huéspedes que consumen alimentos contaminados con *L. monocytogenes* (Pérez, 2013). El 1 - 5 % de los seres humanos son portadores intestinales asintomáticos de esta bacteria. (Brackett, 1988)

Información obtenida con respecto al origen de los brotes de listeriosis, indican que los alimentos listos para consumir y conservados por un período de tiempo prolongado a temperatura de refrigeración, como son la leche y los productos lácteos son de alto riesgo. La leche es inocua al extraerla y no contiene microorganismos patógenos en su composición; sin embargo, es un caldo de cultivo que permite el desarrollo de patógenos contaminantes medioambientales entre los cuales se encuentra *L. monocytogenes*. La listeriosis humana es poco común; no obstante empezó a manifestarse como una enfermedad de transmisión alimentaria emergente. Puede presentarse como casos aislados o en brotes asociados al consumo de alimentos contaminados (Cruz *et al.*, 2012), entre los alimentos frecuentemente

contaminados podemos encontrar el queso, la leche cruda y pasteurizada (David *et al.*, 1985), carnes frescas de mamíferos, aves y productos cárnicos fermentados y pasteurizados, pescados y mariscos tanto frescos como ahumados, frutas, hortalizas y verduras.

En el presente estudio se ha evaluado la supervivencia de *L. monocytogenes* en un producto alimenticio pasteurizado de primera necesidad como es la leche; estableciendo como medidas de control diferentes temperaturas y tiempos a los cuales es mantenida para su conservación, con la finalidad de determinar la temperatura y el tiempo más adecuado para disminuir la presencia de este microorganismo, y por consecuencia disminuir el riesgo de listeriosis humana.



## **II. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN**

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) constituyen uno de los problemas sanitarios más comunes y de mayor impacto sobre la salud de las personas en el mundo. Afectan principalmente a la población vulnerable y trae consigo perjuicios, no solo para la salud humana, sino también para el comercio, el turismo y el sector agroindustrial (Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2010).

En Perú, las ETAs afectan principalmente a los sectores más necesitados de la población, originándose aproximadamente el 90% de las mismas, por el consumo de comidas en restaurantes, pollerías, escuelas, venta callejera e incluso en el propio hogar, como consecuencia de la mala práctica durante la obtención, recepción, almacenamiento, preparación y suministro final de los alimentos (Prompyme, 2007).

*L. monocytogenes* está emergiendo como una importante bacteria patógena transmitida por los alimentos debido a cambios en la producción (riego

con aguas servidas), procesamiento y distribución de los alimentos, la mayor utilización de la refrigeración para conservar los alimentos, la preferencia de la población por alimentos listos para el consumo (LPC) y un incremento del número de personas consideradas con alto riesgo de sufrir enfermedades, como ancianos, gestantes, recién nacidos e inmuno deprimidos (Organización Mundial de Salud Animal, 2004; Madigan *et al.*, 2004).

Sólo a partir de comienzos de los años 80 la listeriosis fue reconocida como una enfermedad transmitida por los alimentos, al ocurrir en Estados Unidos y Europa varios brotes en que se demostró mediante estudios epidemiológicos que *L. monocytogenes* aislada tanto del alimento como de los pacientes correspondían a la misma cepa (Schlech *et al.*, 1983).

## **2.1 Efecto de bajas temperaturas y tiempo en el control de *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* se describió por primera vez hace más de 60 años, por Murray *et al.* en 1926, la denominaron *Bacterium monocytogenes* porque infectaba a los leucocitos sanguíneos. Pirie en 1930 aisló en hígado de gerbos una bacteria similar a la que denominó *Listerella hepatolytica* en nombre del famoso cirujano Joseph Lister (1827-1912). Fue en 1940, finalmente, cuando se acordó el nombre actual de *L. monocytogenes*.

La clasificación taxonómica de *Listeria monocytogenes* es:

Dominio	:	Bacteria
Phyllum	:	Firmicutes
Clase	:	Bacilli
Orden	:	Bacillates
Familia	:	Listeriaceae
Género	:	<i>Listeria</i>

Hasta el año 2007, 6 especies de *Listeria* habían sido publicadas en la lista de validación del IJSEM ("International Journal of Systematic and Evolutionary

Microbiology"): *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii* (subsp. *ivanovii* y *londoniensis*), *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi* y *Listeria welshimeri*, en 2010 *Listeria marthii* es validada como especie (Graves *et al.*, 2010) y recientemente se ha validado *Listeria rocourtiae* (Leclercq *et al.*, 2010); siendo *Listeria ivanovii* y *Listeria monocytogenes* las especies patógenas responsables de infectar al ser humano (Guillet *et al.*, 2010). Dentro de *L. monocytogenes* se encuentran 13 serotipos, los responsables de más del 90% de casos de listeriosis humana y animal son los serotipos 4b, 1/2 a y 1/2 b (Low *et al.*, 1993; Allen & Konemaan, 2008).

*L. monocytogenes* es un bacilo corto, Gram-positivo, no esporógeno, que se encuentran en pares o como células aisladas de 10 µm de longitud. Algunas veces se observan en cadenas cortas en forma de V o Y o formando empalizadas. Las colonias son pequeñas (1-2 mm tras 1 o 2 días de incubación) y lisas. Su temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C, pero puede crecer a 4°C, ya que es una bacteria psicrotrofa. Es una bacteria anaerobio facultativa, móvil a 25°C con una modalidad de "volteo" o "barrilete" mediante flagelos peritricos e inmóviles a 35°C (Junttila *et al.*, 1988; Miller, 1992; Larson *et al.*, 1999). Es un microorganismo con reacción positiva a la prueba de la catalasa y oxidasa negativo; las reacciones de Vogues-Proskauer y rojo metilo son positivas, no producen indol ni H<sub>2</sub>S. Además produce ácido por la fermentación de varios azúcares: D-glucosa, D-arabitol, ramnosa y es β-hemolítica.

*L. monocytogenes* crece en un amplio rango de ecosistemas; se encuentra ubicua en la naturaleza, tanto en el suelo como en la vegetación en descomposición, en agua fresca y en aguas residuales, también forman parte de la materia fecal de muchos mamíferos (Torres *et al.*, 2004; Allen & Koneman, 2008), sobre todo en los rumiantes (Norrung & Andersen, 2000). Esta bacteria es contaminante frecuente de plantas procesadoras de alimentos, llegando a contaminar las superficies que contactan con los alimentos; incluido el producto mismo (Brock *et al.*, 2003; Aguado *et al.*, 2006; Jay *et al.*, 2009).

Se considera a *L. monocytogenes* como un microorganismo que cuenta con una ecología microbiana muy diversa para asegurar su supervivencia, una de las características que podemos destacar es la temperatura. Esta bacteria puede sobrevivir en condiciones de congelación, resistiendo varias semanas a -18°C en varios sustratos alimenticios. Su rango de temperatura de crecimiento oscila desde 0 a 50°C, con un pH neutro y con elevadas concentraciones de nutrientes en el ambiente, *L. monocytogenes* presenta un crecimiento lento con tiempos de generación de 3 a 6 días, y ante su exposición a microorganismos competitivos y niveles bajos de pH a veces sobrevive sin multiplicarse a 4°C. La temperatura mínima media de crecimiento en agar tripticasa de soja de 78 cepas de *L. monocytogenes* fue de 1,1 a 0,3°C, con una variación de 0,5 a 3°C; sugiriendo que la hemolisina de estas cepas incrementan el crecimiento y supervivencia en medios fríos (Jay, 1992).

Se estudió el crecimiento de tres cepas de *Listeria monocytogenes* a temperaturas de refrigeración (-0,5 a 9,3°C) en caldo de pollo y / o leche UHT utilizando un gradiente de temperatura de la incubadora de balanceo. Temperaturas mínimas de crecimiento variaron -0,1 a -0,4°C para las tres cepas. Se observaron tiempos de retardo de 1 a 3 días y 3 a 4 días con incubación a 5 y 0°C respectivamente. Tiempos de generación correspondiente oscilaron desde 13 hasta 24 horas a 5°C y 62 a 131 horas a 0°C (Walker, 1990).

Se analizó el efecto de pH 3.0-6.5 dado por diferentes concentraciones de acidulantes (ácido cítrico, ácido láctico y ácido ascórbico) y de la temperatura de refrigeración (4 y 10°C) sobre el desarrollo y supervivencia de *Listeria monocytogenes* en caldo de cultivo triptona soya y extracto de levadura. Se observó disminución de velocidad de desarrollo de *L. monocytogenes* con la disminución de temperatura (Moscoso, 1993).

La influencia del pH y cloruro de sodio (NaCl) en la supervivencia y el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en el jugo de zanahoria se determinó.

El orden de letalidad y las concentraciones de inhibición fue 10% > 1% > 100% > 0,1% de jugo de zanahoria y aumentó a medida que la temperatura de incubación se redujo de 20 a 12°C, y nuevamente de 12 a 5°C. Este efecto fue más pronunciado cuando el 10% de jugo de zanahoria se incubó a 5°C. (Beuchat *et al.*, 1994).

Superficies intactas y cortadas de fresas frescas se inocularon con un cóctel de cinco cepas de *Listeria monocytogenes* ( $10^6$  (bajo inóculo) y  $10^8$  (alto inóculo) UFC por cada tres muestras). Las fresas inoculadas se secaron durante 1 h a 24 °C y se almacenaron en recipientes cerrados en 4 y 24°C. Cuando se mantiene en 4°C, una reducción de aproximadamente 3 ciclos por muestra intacta se observó para ambos inóculos a los 7 días, mientras que las poblaciones sobre superficies cortadas se mantuvieron constantes. Las fresas cortadas inoculadas (6,7 log UFC/25 g de muestra) se congelaron a -20°C, después de 28 días las poblaciones de *L. monocytogenes* habían disminuido en un 0 a 1,2 ciclos. Los resultados indican que *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir pero no desarrolla crecimiento en la superficie de las fresas frescas intactas o cortadas en toda la vida útil y puede sobrevivir con fresas congeladas durante períodos de al menos 4 semanas (Flessa *et al.*, 2004).

Fenólicos optimizados a partir de extractos de orégano y de arándano fueron evaluados para la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* en los medios de laboratorio y en la carne de pescado. La inhibición por fitoquímico y las sinergias de ácido láctico fue más efectivo cuando la carne de pescado rebanadas fueron almacenadas a 4°C durante 8 días (Lin *et al.*, 2004).

Se evaluó la probabilidad de crecimiento de *L. monocytogenes* en carne de cerdo, se analizaron 96 productos y se clasificaron en función a su procesamiento teniendo en cuenta el pH, actividad de agua ( $a_w$ ) y conservantes. Los productos fueron contaminados artificialmente con concentraciones

iniciales entre  $10^2$  y  $10^3$  UFC por g de producto de las cepas individuales o agrupados y se almacenaron a 8°C o el primer tercio de su vida útil a 4°C y, a continuación, los dos tercios restantes a 8°C. El tiempo de almacenamiento utilizado comprende entre 30 y 90 días. En productos de carne de cerdo cocinada se obtuvieron 43 muestras positivas ante una predicción de 0 muestras positivas, los productos de carne de cerdo frita no mostraron crecimiento de *L. monocytogenes* significativo y, los productos de carne de cerdo en salmuera dio un resultado de 7 muestras positivas ante una predicción de solamente 2 muestras positivas (Augustin *et al.*, 2005).

Se adicionaron las combinaciones de compuestos fenólicos en concentraciones de 100 y 200 mg/l en carne inoculada con *L. monocytogenes* y se incubaron a 20 y a 4°C durante 21 días. Se realizaron dos controles sin compuestos fenólicos. A 20°C, en el medio control se observa crecimiento de 3,87 ciclos logarítmicos, a 21 días. En el medio control de carne de pescado, a 4°C, se observa crecimiento de *L. monocytogenes*, incrementando a 21 días 0,60 ciclos logarítmicos. Los resultados demuestran el crecimiento de *L. monocytogenes* está directamente relacionado a la temperatura (Rodríguez & Manca de Nadra, 2009).

La probabilidad de crecimiento de las células de *Listeria monocytogenes* se caracterizó en caldo de soja triptona suplementado con extracto de levadura 0,6% a temperatura que van de 5 a 25°C, pH en el intervalo 4,4 a 6,5, y la actividad de agua que oscila 0,919-0,989. El crecimiento se monitorizó en placas de 96 micropocillos y la probabilidad de crecimiento se dedujo a partir de concentraciones estimadas con el cálculo de NMP (Número más probable). Se trabajó con una temperatura mínima individual para el crecimiento que varió de -3,6°C [-4,5°C, -2,7°C] a 17,3°C [16,0°C, 18,6°C]. La variabilidad observada en el experimento fue grande, respecto a la temperatura utilizada se encontró que la probabilidad de crecimiento osciló de 0,52 hasta 0,94 a los 15°C (Augustin & Czarnecka-Kwasiborski, 2012).

Se ha realizado el recuento y la detección de *Listeria monocytogenes* en 51 productos cárnicos cocido LPC, comprados en establecimiento de venta al por menor. Los análisis microbiológicos se realizaron el mismo día de la compra, a mitad del período de duración mínima con almacenamiento a 4°C y 10°C, así mismo al final de este período y almacenadas a las mismas temperaturas. Ninguna muestra presentó recuentos el día de la compra, una muestra presentó recuentos a lo largo de su período de duración mínima almacenadas a 4° y 10°C, siendo mayor el número de UFC/g a 10°C, oscilando los recuentos entre  $1 \times 10$  a  $5,9 \times 10^2$  UFC/g. En un 19,6 % de las muestras se detectó *L. monocytogenes*, existiendo en el almacenamiento de los productos a 10°C, un incremento de ambas especies hasta mitad del periodo de duración mínima, aumentando la presencia de *L. monocytogenes* hasta el final (Ruesca, 2012).

## **2.2 La leche**

La leche es el producto de la secreción normal de la glándula de los mamíferos. La leche de consumo directo es la que se produce con la intención de ser vendida directamente al consumidor, incluye la leche cruda y las leches procesadas (leches líquidas, leches comercializadas). Desde el punto de vista microbiológico, sin embargo, se considera como cruda a cualquier leche que no haya sido sometida al menos a tratamientos térmicos de pasteurización. Otras leches líquidas para el consumo directo son: pasteurizada, esterilizada, tratada a temperatura muy elevada (UHT); todas ellas pueden ser enteras, semidesnatadas, desnatadas y aromatizadas (ICMSF, 1998).

La leche es un buen medio de crecimiento para muchos microorganismos debido a su gran contenido de agua, a su pH neutro y a su gran variedad de nutrientes disponibles. Los principales componentes nutritivos de la leche están constituidos por lactosa, grasa, proteína, minerales y diversos compuestos nitrogenados no proteicos. Muchos microorganismos no pueden usar la lactosa y por ello dependen de la proteólisis y lipólisis para conseguir carbono y energía.

Además, la leche recién ordeñada contiene diversos inhibidores del crecimiento cuya eficacia disminuye con el transcurso del tiempo.

Las fuentes de carbono de la leche son la lactosa, la proteína y la grasa. El citrato de la leche lo utilizan muchos microorganismos pero no se encuentra en cantidades suficientes para un crecimiento significativo. En la leche hay una cantidad suficiente de glucosa para que se inicie el desarrollo de algunos microorganismos, pero los fermentadores para continuar creciendo deben tener un buen sistema de transporte y unas enzimas hidrolíticas que permitan el aprovechamiento de la lactosa.

Aunque la leche tiene un contenido lipídico abundante, son pocos los microorganismos que aprovechan la grasa como fuente de carbono o energía. Esto se debe a que la grasa se presenta en forma de glóbulos que están rodeados de una membrana protectora compuesta de glucoproteínas y fosfolípidos. La grasa de la leche sólo está disponible para el metabolismo microbiano cuando la membrana globular está dañada físicamente o degradada enzimáticamente.

Fundamentalmente son dos los tipos de proteínas de la leche: caseínas y proteínas del suero. Las primeras se encuentran como micelas muy hidratadas y son muy sensibles a la proteólisis. Las proteínas del suero son menos sensibles a la proteólisis (Doyle, 2001).



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Materiales**

##### **3.1.1 Material biológico**

El material biológico estuvo representado por la cepa de *Listeria monocytogenes* otorgada por la Gerencia Regional de Salud de la ciudad de Lima y leche pasteurizada presentada en caja marca Gloria adquirida en Supermercados Metro S.A en la ciudad de Lambayeque.

##### **3.1.2 Población y muestra de estudio**

La población estuvo constituida por *Listeria monocytogenes* a una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL.

#### **3.2 Métodos**

##### **3.2.1 Variables de estudio**

La variable dependiente fue el control de *Listeria monocytogenes* a una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL y la variables independientes fueron las bajas temperaturas (-10, -5, 0, 5 y 10°C) y el tiempo (24, 48, 72 y 96 horas).

### **3.2.2 Tipo de estudio y Diseño de contratación de hipótesis**

El trabajo de investigación fue de tipo Experimental y para contrastar la hipótesis se utilizó un diseño clásico.

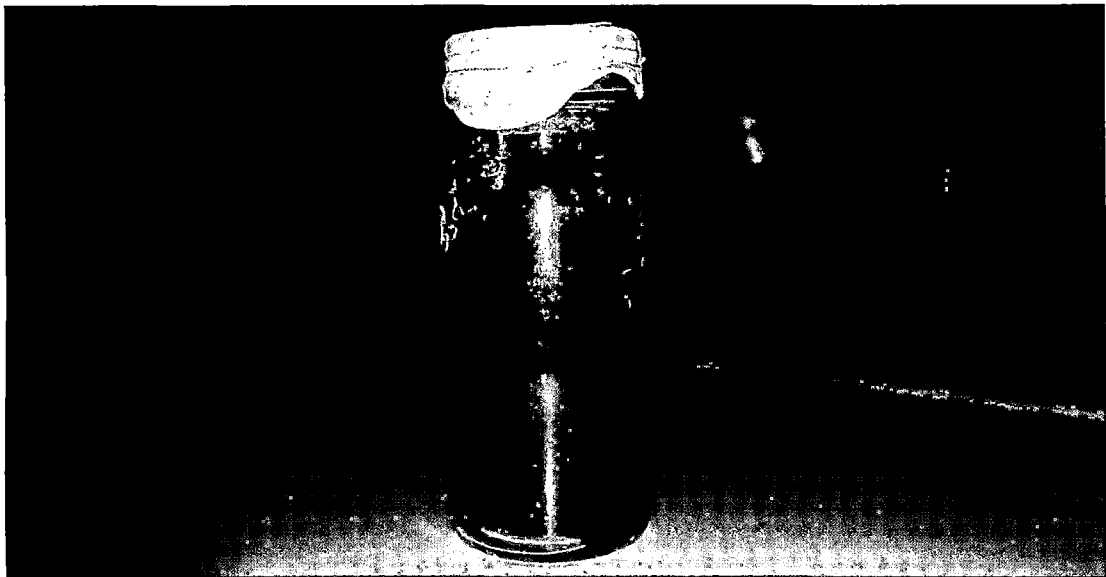
### **3.2.3 Aislamiento e Identificación de *Listeria monocytogenes***

La cepa de *Listeria monocytogenes* proporcionada por la Gerencia Regional de Salud – Sede Lima fue recibida en condiciones apropiadas de bioseguridad y mantenida a 5°C haciendo uso de una hielera, posteriormente se confirmó su identificación mediante la técnica de tinción GRAM en la cual se observaron bacilos cortos, Gram-positivos, dispuestos en pares con algunos aislados, y la prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson (CAMP) cuya positividad se manifiesta con la generación del factor CAMP por parte de *L. monocytogenes* el cual produce un sinergismo con la beta lisina producida por *Staphylococcus aureus* sobre los eritrocitos generando una lisis de estos; adicionalmente se sembró la cepa de *L. monocytogenes* en placas con Agar Sangre de Oveja y así se apreció la  $\beta$  hemólisis característica de este microorganismo.

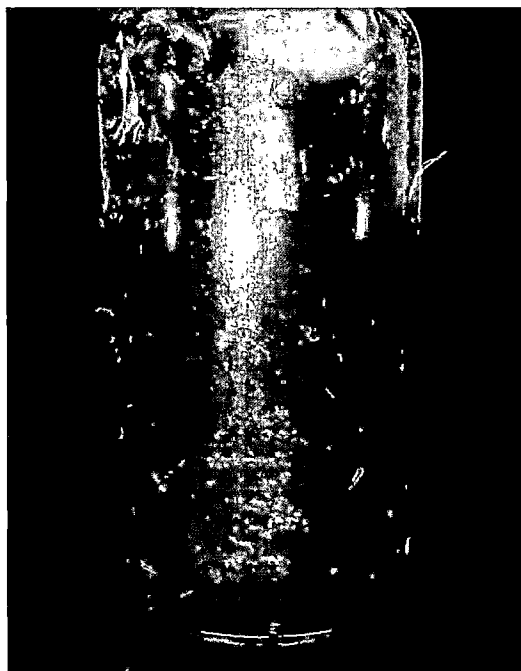
### **3.2.4 Multiplicación de *Listeria monocytogenes***

Para la multiplicación de *L. monocytogenes*, en primer lugar se replicó la cepa en 10mL de caldo de enriquecimiento selectivo para *Listeria* según Fraser contenida en un tubo de dilución durante 24 horas a 37°C y se consideró como cultivo puro, al observarse la turbidez del medio de cultivo acompañada una capa uniforme brillante y viraje del indicador a un color azulado en la superficie. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a tomar una ansada del cultivo preparado y se sembró utilizando el método de estría en tres cuadrantes en placas con Agar Oxford en un tiempo de incubación de 24-48 horas a 37°C.

La lectura de las colonias características de *L. monocytogenes* en Agar Oxford correspondieron a colonias pequeñas con un tamaño no mayor a 1mm, redondas, brillantes de color gris azulado rodeadas de un halo negro y con una depresión central, se las consideró compatibles con el género *Listeria*.



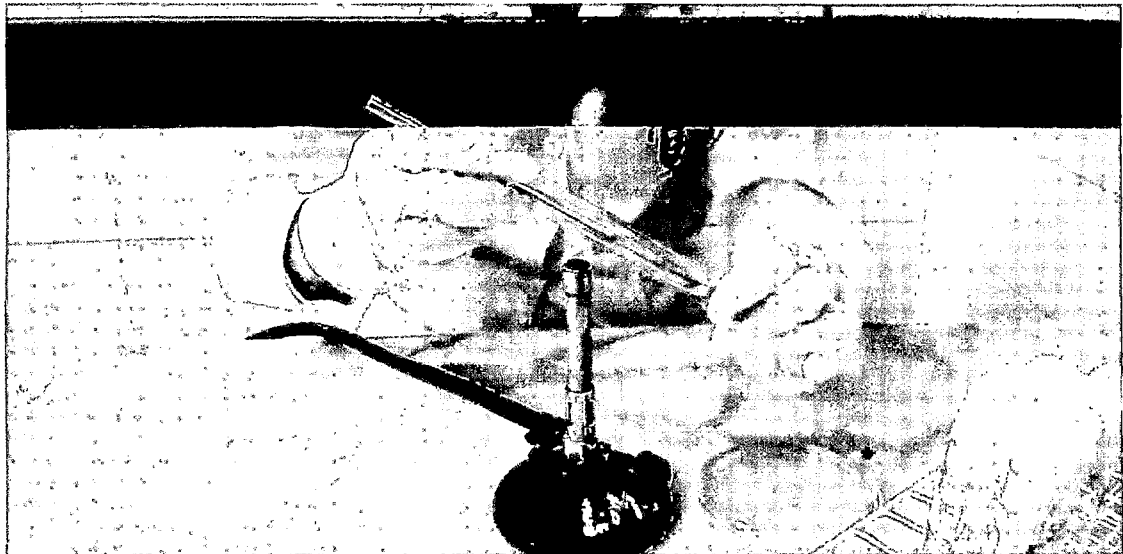
**Figura 1.** Cepa de *L. monocytogenes* proporcionada por la Gerencia Regional de Salud – Sede Lima.



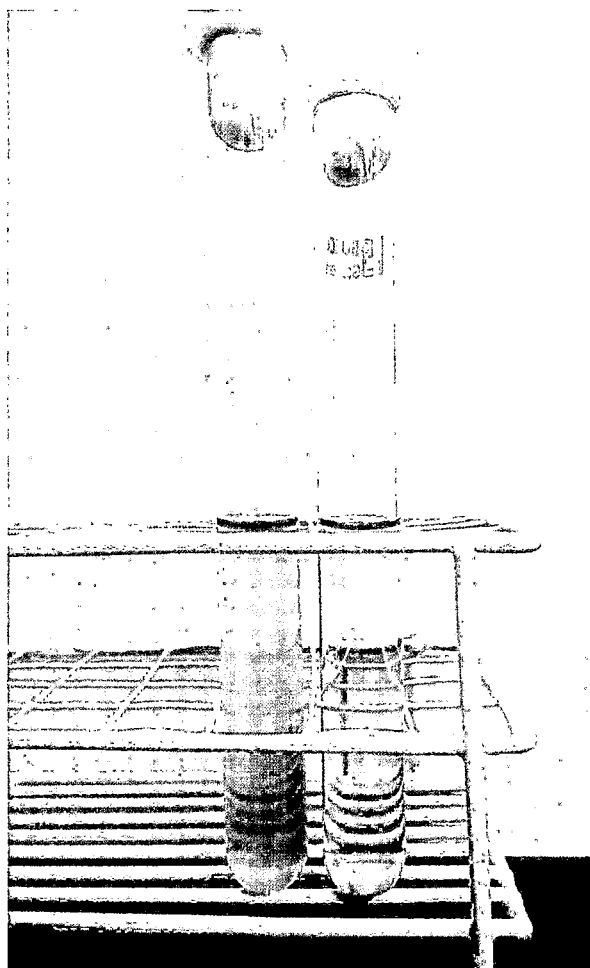
**Figura 2.** Crecimiento de *L. monocytogenes* en Agar Tripticasa Soya suplementado con Glucosa.



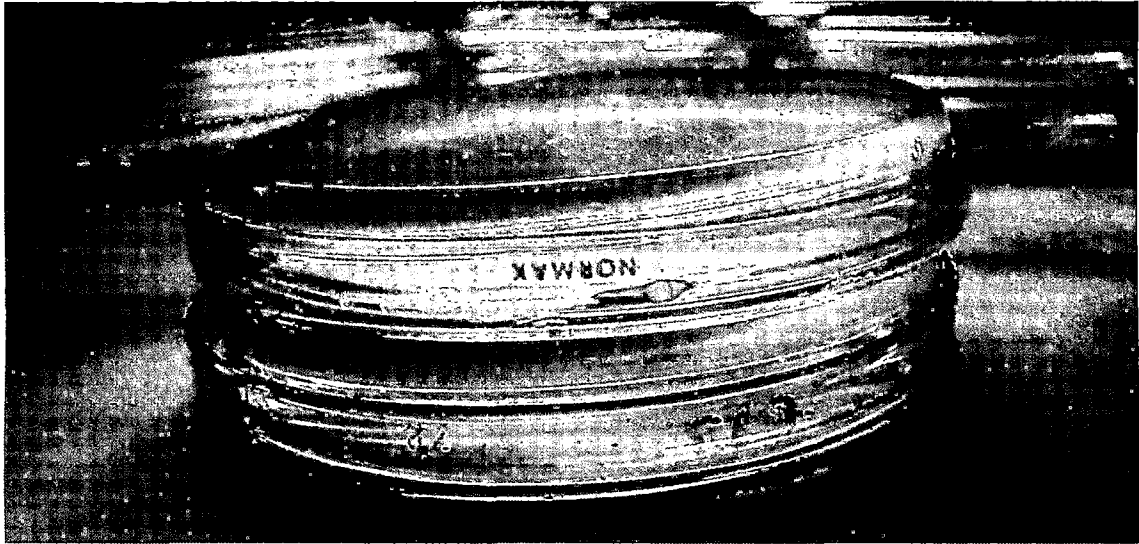
**Figura 3.** Leche pasteurizada presentada en caja marca Gloria.



**Figura 4.** Siembra de *L. monocytogenes* en Caldo de enriquecimiento según Fraser.



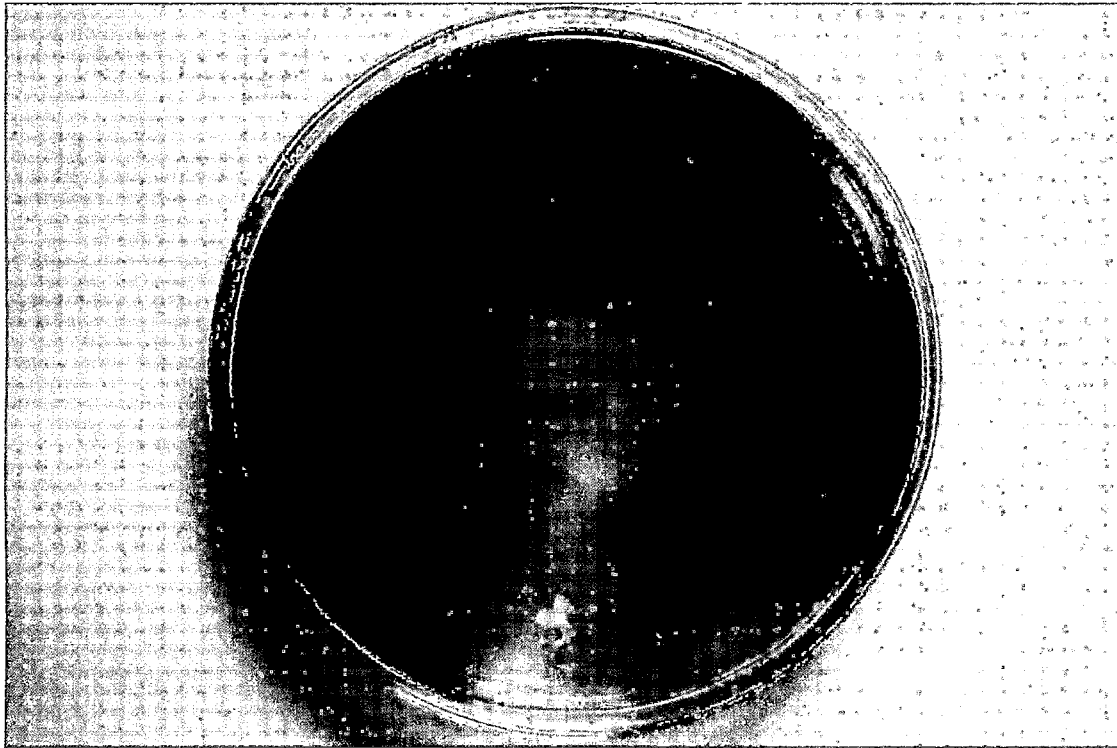
**Figura 5.** Crecimiento de *L. monocytogenes* en Caldo de enriquecimiento según Fraser incubado a 37°C durante 24 horas.



**Figura 6.** Placas servidas con Agar Oxford.



**Figura 7.** Siembra de *L. monocytogenes* en placa con Agar Oxford.



**Figura 8.** Crecimiento de *L. monocytogenes* en placa con Agar Oxford.



**Figura 9.** Colonias de *L. monocytogenes* en placa con Agar Oxford.

### 3.2.5 Preparación del inóculo e Inoculación en el producto

El inóculo fue preparado según estándares establecidos en Food and Drug Administration, FDA & Bacteriological Analytical Manual, BAM (2011), se sembró a *L. monocytogenes* mediante estría en 3 cuadrantes en una placa de Agar Oxford durante 24 horas a 37°C con la finalidad de obtener colonias jóvenes aisladas. Posteriormente se sembró una colonia joven de *L. monocytogenes* en 10mL de caldo de enriquecimiento selectivo para Listeria según Fraser en un tubo de dilución y se incubó a 37°C durante 24 horas.

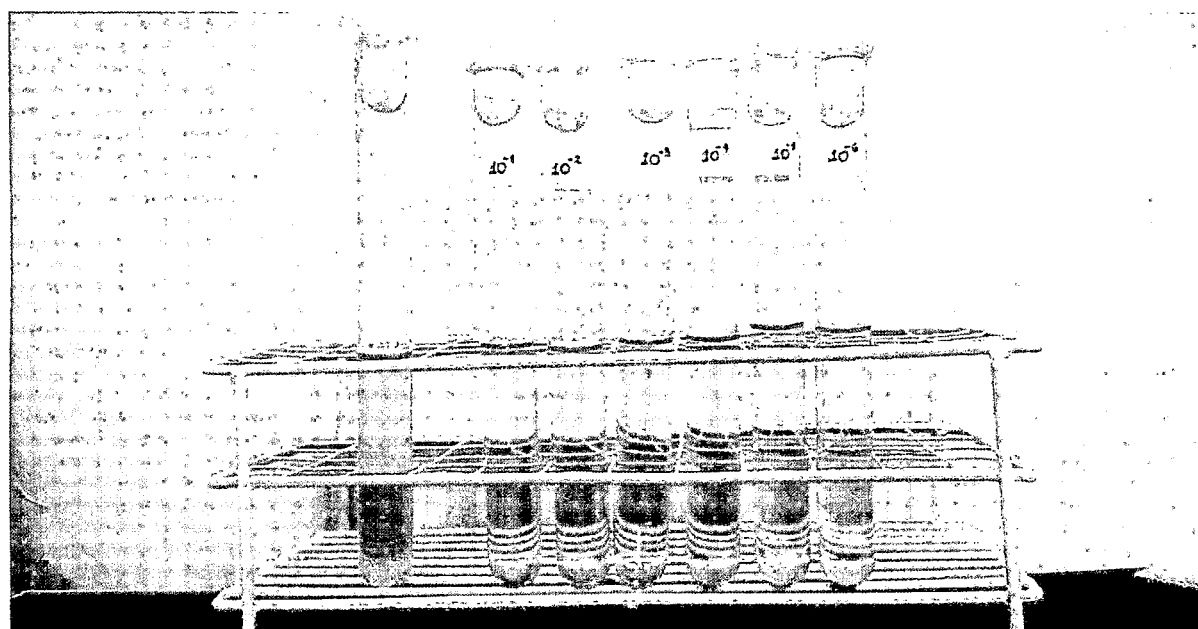
A continuación se realizaron diluciones del cultivo joven preparado, se extrajo 1mL de dicho cultivo utilizando una pipeta estéril y se transfirió a un tubo con 9mL de Caldo de enriquecimiento selectivo para Listeria según Fraser, se homogenizó y se extrajo 1mL de esta primera dilución para transferirlo a otro tubo con 9mL de Caldo de enriquecimiento selectivo para Listeria, se repitió este procedimiento hasta la 6ta dilución para así obtener un inóculo entre  $10^6$ - $10^7$  UFC/mL. Adicionalmente el inóculo preparado fue sometido a un recuento inicial para su posterior comparación con los resultados obtenidos.

Luego se procedió a la inoculación de 1mL del inóculo obtenido con la 6ta dilución en cada uno de los 60 frascos estériles servidos con 100mL de leche pasteurizada; la leche empleada en el experimento ha sido sembrada mediante estría simple en placas con Agar Mac Conkey y Agar Nutritivo durante 24 horas a 37°C para asegurar el proceso de pasteurización y la probabilidad de microbiota acompañante resultado de la manipulación.





**Figura 10.** Extracción de 1mL del cultivo joven de *L. monocytogenes*



**Figura 11.** Diluciones seriadas del inóculo de *L. monocytogenes* desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ .



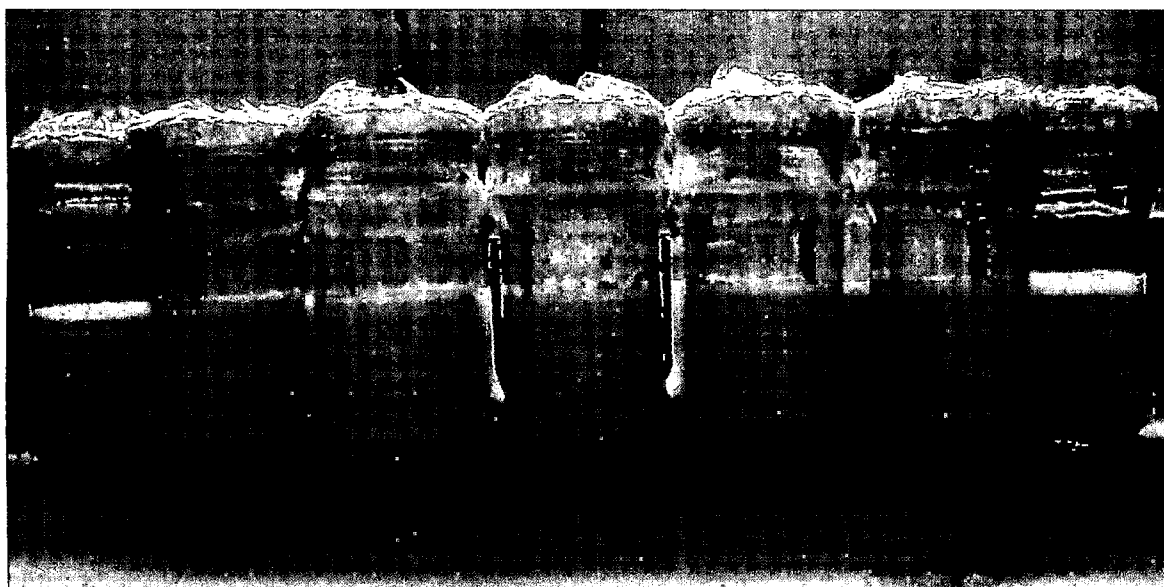
**Figura 12.** Llenado de los frascos con 100mL de leche pasteurizada.



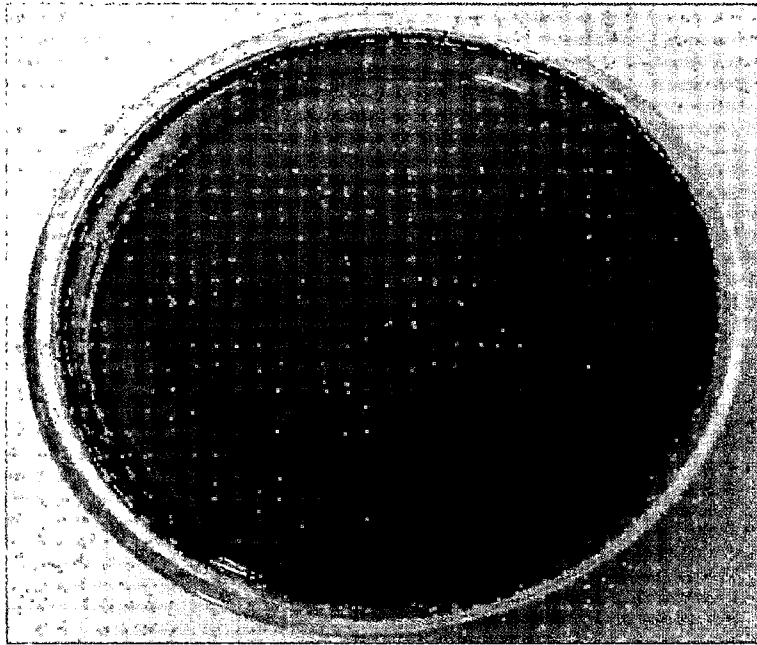
**Figura 13.** Extracción de 1mL del inóculo de *L. monocytogenes* a  $10^6$  UFC/mL



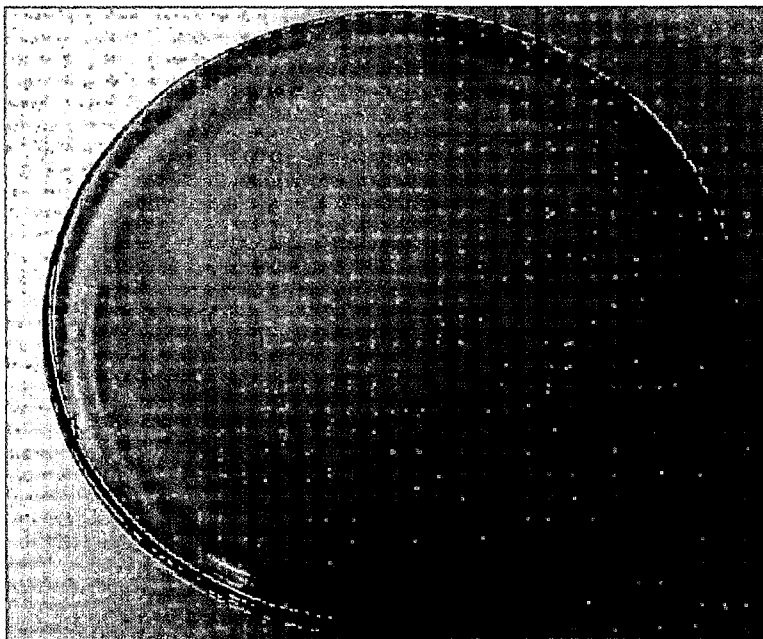
**Figura 14.** Inoculación de *L. monocytogenes* a  $10^{-6}$  UFC/mL en leche pasteurizada.



**Figura 15.** Frascos inoculados con *L. monocytogenes*.



**Figura 16.** Crecimiento bacteriano de leche pasteurizada en Agar Mc. Conkey incubada a 37°C durante 24 horas.

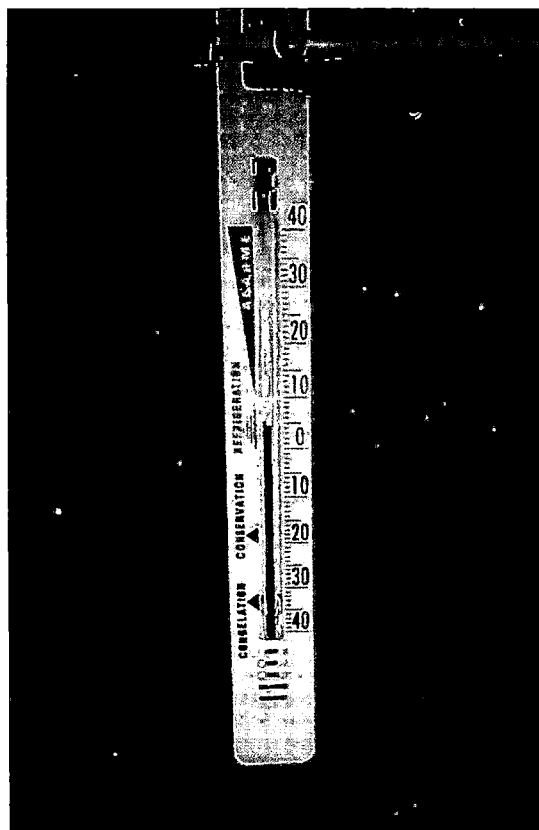


**Figura 17.** Crecimiento bacteriano de leche pasteurizada en Agar Nutritivo incubada a 37°C durante 24 horas.

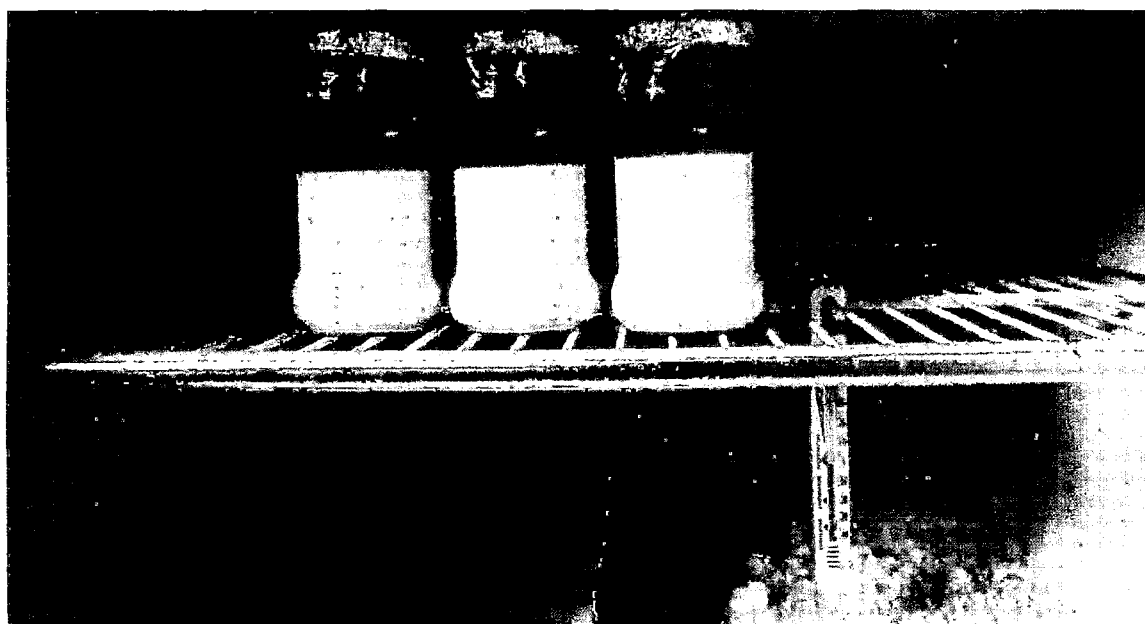
### 3.2.6 Exposición de la muestra a temperaturas bajas y a diferentes tiempos

El inóculo preparado a partir de la cepa de *L. monocytogenes* con una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL fue sembrado en un total de 6000mL de leche pasteurizada.

Se utilizaron 12 frascos inoculados para ser incubados por cada una de las temperaturas bajas establecidas (-10, -5, 0, 5 y 10°C) haciendo uso de una refrigeradora acondicionada con un termómetro para temperaturas de refrigeración, conservación y congelación en el control de la temperatura, por un tiempo determinado (24, 48, 72 y 96 horas) sin abrir la refrigeradora hasta transcurrido el tiempo de incubación para cada temperatura.



**Figura 18.** Termómetro para bajas temperaturas de -40°C a 40°C.



**Figura 19.** Exposición a bajas temperaturas de los frascos inoculados con *L. monocytogenes*.

### 3.2.7 Control de la acción de las temperaturas bajas considerando el tiempo de exposición

Transcurrido el tiempo determinado de incubación se aplicó la técnica de recuento de microorganismos con siembra por profundidad en el análisis de 3 frascos por día respectivo de cada temperatura. Se empleó caldo de enriquecimiento selectivo para *Listeria* según Fraser en la realización de las diluciones repitiendo el procedimiento indicado en la preparación del inóculo y, a continuación se realizó la siembra por duplicado de 1 mL de cada dilución preparada en placas que luego fueron servidas con Agar Oxford como medio selectivo para la siembra de *L. monocytogenes* e incubadas a 37°C durante 24 horas. Al finalizar el recuento de cada día se desecharon los frascos analizados.

Al finalizar el tiempo de incubación de las placas, se procedió a contar las colonias de *L. monocytogenes*, teniendo en cuenta las características mencionadas anteriormente para su crecimiento en Agar Oxford y, mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$UFC/mL = \frac{\text{Número de colonias}}{\text{Factor de dilución} \times \text{mL de la muestra sembrada}}$$

Teniendo en cuenta el promedio de UFC/mL de *L. monocytogenes* para cada temperatura (-10, -5, 0, 5 y 10°C) durante un tiempo determinado (24, 48, 72 y 96 horas), se continuó con el cálculo del número de reducción de ciclos logarítmicos de crecimiento de *L. monocytogenes* haciendo uso de la siguiente ecuación (Rees y Bettison, 1991):

$$\log 10 \frac{N_2}{N_1} = k'(t_2 - t_1), \text{ donde } k' = \frac{k}{2.303}$$

Donde:

$N_2/N_1$ : es la proporción del número inicial de microorganismos que sobrevivieron

$t_2 - t_1$ : es el intervalo de tiempo de crecimiento para los microorganismos

$K$ : es el rango de la reacción

$\log_{10} N_2/N_1$ : es el número de reducción de ciclos logarítmicos en el número de microorganismos en el intervalo de tiempo.

Adicionalmente se aplicó la fórmula para el cálculo del tiempo de reducción decimal (D) (Singh y Heldman, 1993):

$$D = \frac{x}{\log(N_0/N_x)}$$

Donde:

$N_0$ : es el número de células al inicio del tratamiento

$N_x$ : es el número de células supervivientes después del tratamiento

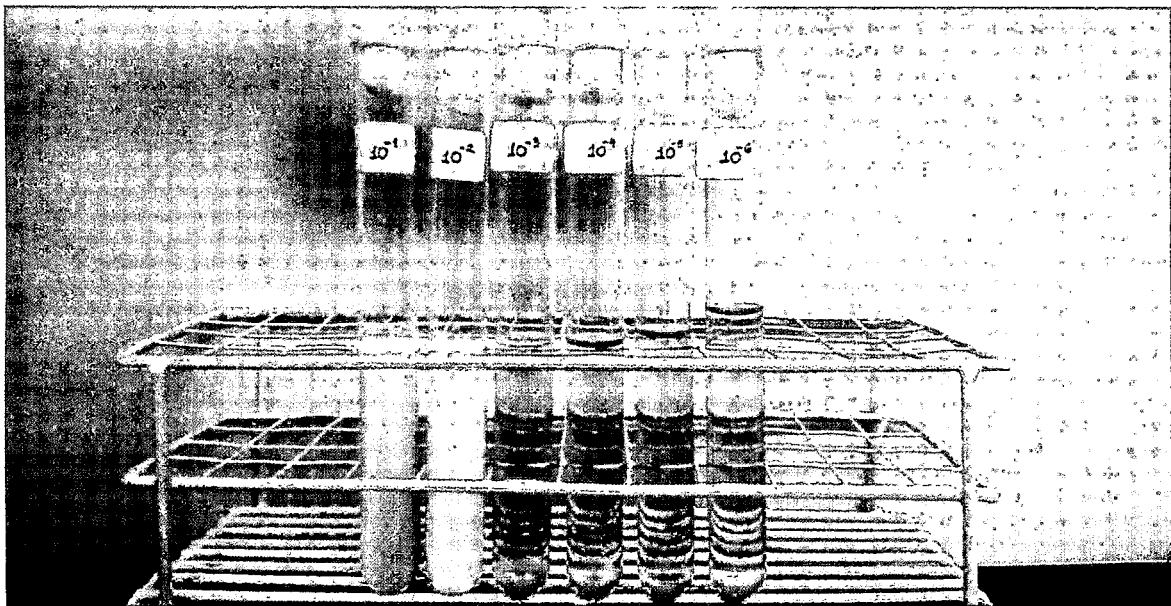
$X$ : es el tiempo de exposición en minutos a una temperatura determinada

La aplicación de las fórmulas descritas tiene como finalidad conocer la temperatura baja que produce un mayor impacto negativo en el ciclo de crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada y, cuánto tiempo requiere para lograr un mayor control de este microorganismo.





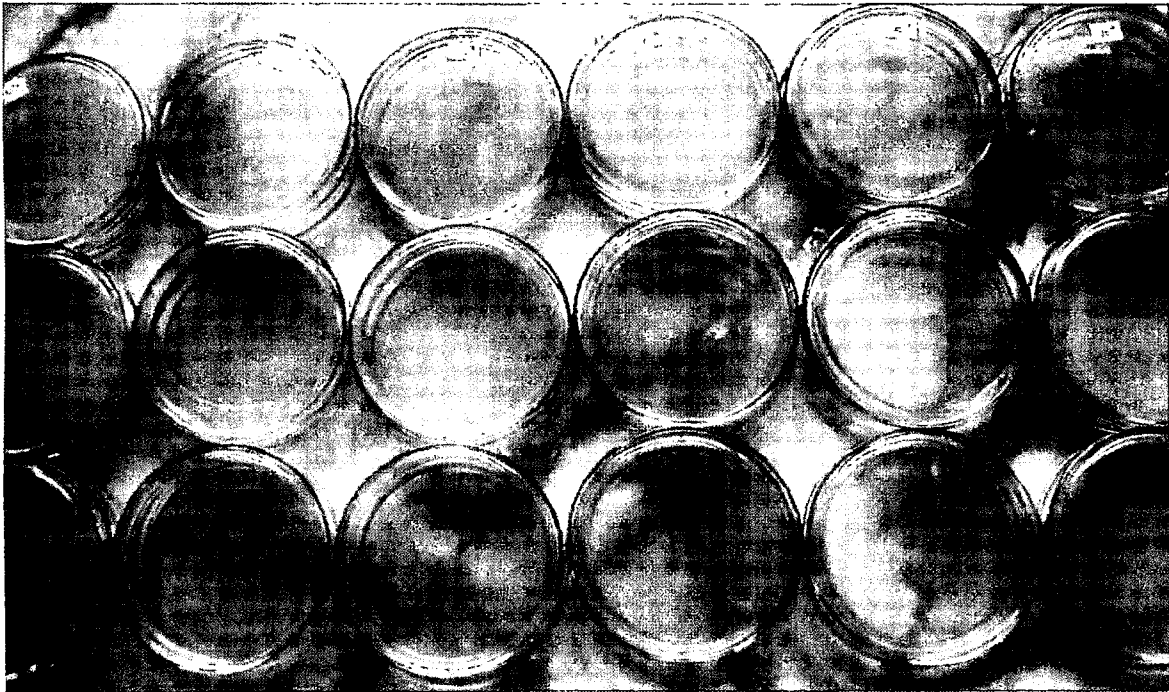
**Figura 21.** Extracción de 1mL de un frasco con leche pasteurizada inoculado con *L. monocytogenes*.



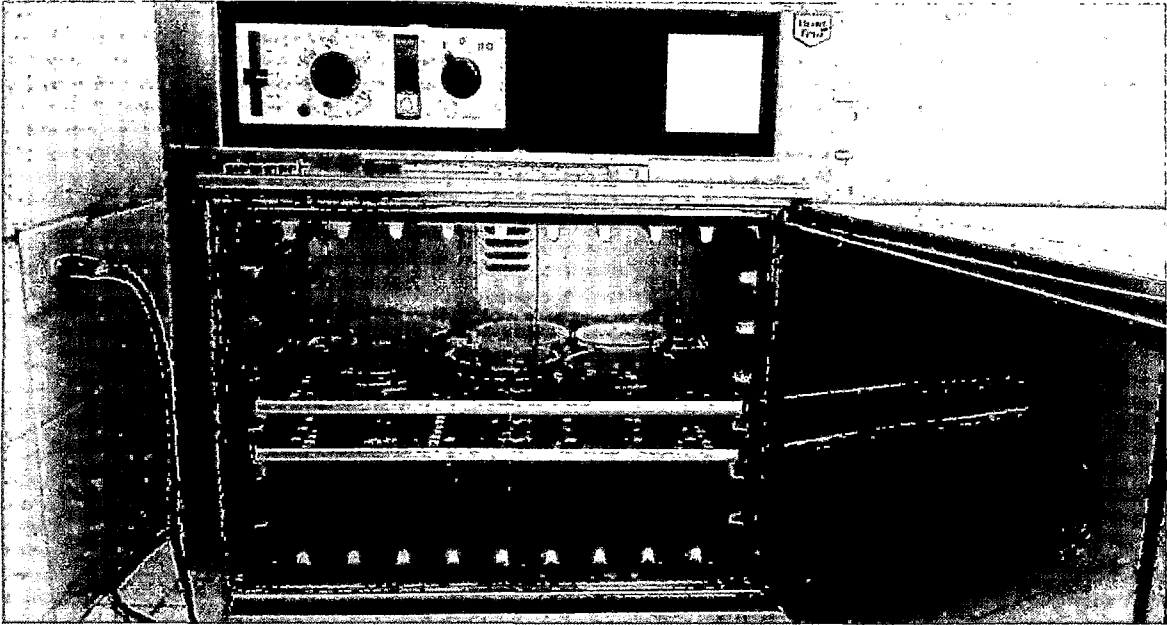
**Figura 20.** Diluciones seriadas de leche pasteurizada inoculada con *L. monocytogenes* desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ .



**Figura 22.** Siembra de 1mL de las diluciones de leche pasteurizada inoculada con *L. monocytogenes* desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ .



**Figura 23.** Placas sembradas por profundidad para cada dilución preparada con su respectivo duplicado.



**Figura 24.** Incubación de las placas sembradas por profundidad a 37°C durante 24 horas.



**Figura 25.** Lectura de las placas sembradas por profundidad después de 24 horas incubadas a 37°C.

### **3.2.8 Análisis de datos**

Se utilizó la técnica de recuento antes y después de la exposición a bajas temperaturas para los tiempos establecidos, adicionalmente se calculó el número de reducción de ciclos logarítmicos con el objetivo de determinar la temperatura baja y el tiempo que controla el crecimiento de *Listeria monocytogenes* a una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL. Los datos obtenidos fueron ordenados en tablas y gráficos. Se utilizaron los programas Microsoft Office Excel versión 2013 y SPSS Statistics versión 19.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 *Listeria monocytogenes*, aislamiento e identificación

La cepa de *L. monocytogenes* recibida por parte de la Gerencia Regional de Salud – Sede Lima demostró las características correspondientes a la especie confirmando así su identificación.

A las 24 de horas de incubación de la cepa de *L. monocytogenes* en caldo de enriquecimiento para *Listeria* según Fraser se observó el crecimiento del microorganismo manifestado por la turbidez del medio de cultivo. La técnica de tinción GRAM realizada a dicho cultivo reveló bacilos cortos, Gram-positivos, dispuestos en pares con algunos aislados característicos de esta bacteria (Figura 21).

Se realizó la prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson (CAMP) para avalar la identificación de la cepa, se sembró a *L. monocytogenes* de forma horizontal para enfrentarla ante *Staphylococcus aureus* sembrada en forma vertical generando una hemólisis con aspecto de flecha producto de la exposición ante la

toxina estafilocócica por lo cual se considera a la cepa como CAMP (+) (Figura 27) y por ende se confirma esta especie. Adicionalmente la cepa fue sembrada en una placa de Agar Sangre de Oveja para observar la  $\beta$  hemólisis característica de esta bacteria (Figura 28).

#### **4.2 Multiplicación de *Listeria monocytogenes***

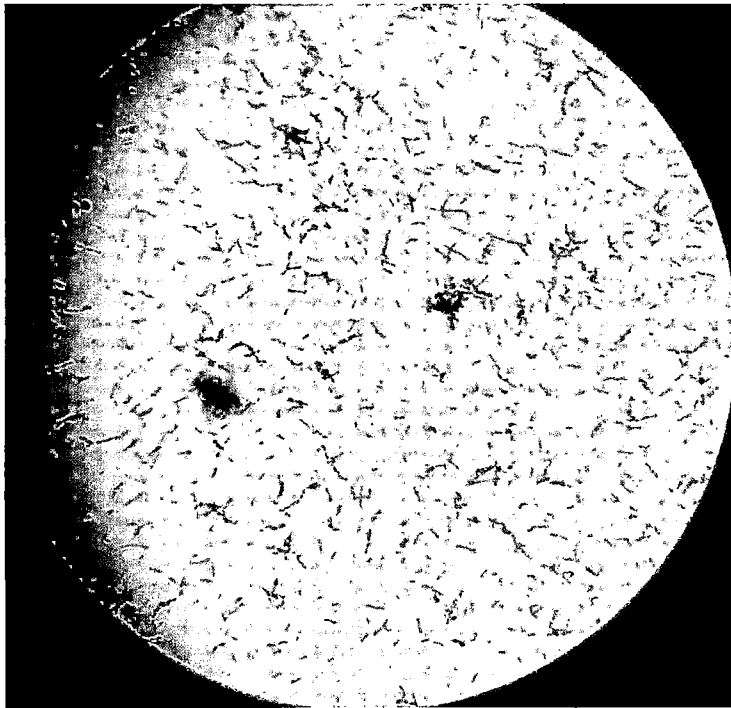
Se obtuvo un cultivo puro de *L. monocytogenes* a las 24 horas de incubación de la bacteria en caldo de enriquecimiento selectivo para *Listeria* según Fraser. Las características observadas fueron la turbidez del medio de cultivo acompañada de una capa uniforme brillante y viraje del indicador a un color azulado en la superficie.

La siembra del cultivo puro de *L. monocytogenes* en placas con Agar Oxford tuvo la finalidad de evidenciar la hidrólisis de la esculina y la selectividad en el medio por la presencia de cloruro de litio, se observó el crecimiento de colonias pequeñas con un tamaño no mayor a 1mm, redondas, brillantes de color gris azulado rodeadas de un halo negro y con una depresión central (Figura 29).

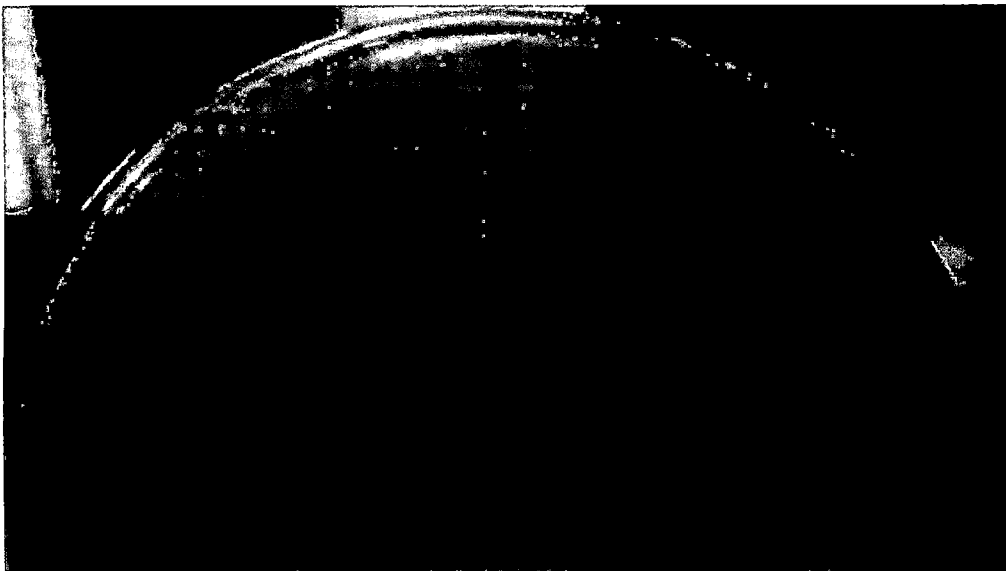
#### **4.3 Efecto del tiempo y las bajas temperaturas en *Listeria monocytogenes***

Se utilizó la técnica de recuento de microorganismos en placa la cual fue adecuada para analizar el crecimiento de *L. monocytogenes* durante el tiempo establecido para cada temperatura determinada.

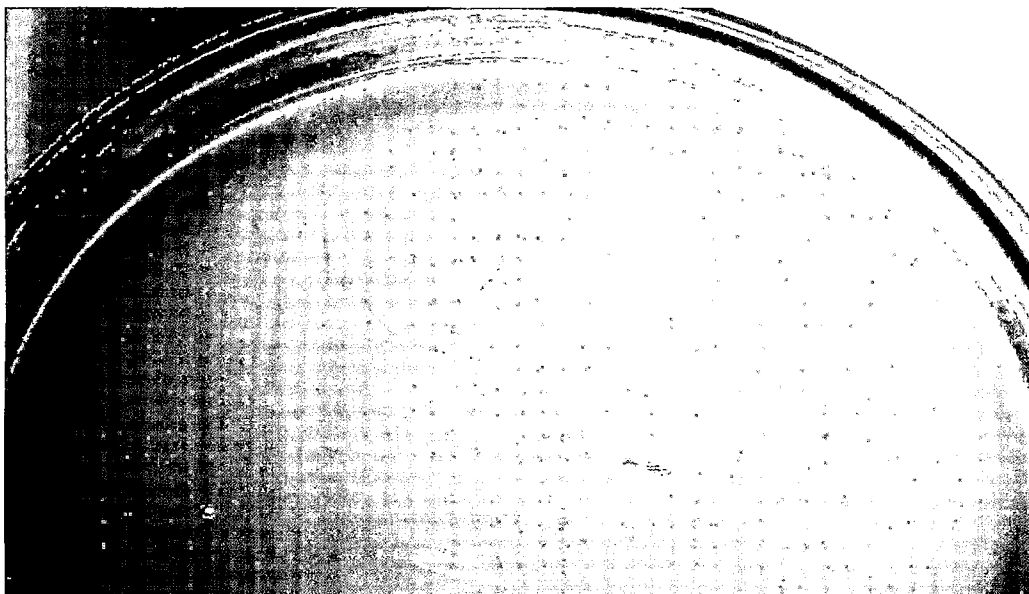
Teniendo en cuenta las características consideradas anteriormente sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* en placas con Agar Oxford, se procedió al conteo de las colonias pertinentes y así se obtuvo la cantidad de UFC/mL (Unidades formadoras de colonias/mL) correspondientes a cada placa sembrada por duplicado para cada una de las diluciones realizadas ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$ ) transcurrido el tiempo determinado para cada una de las temperaturas establecidas.



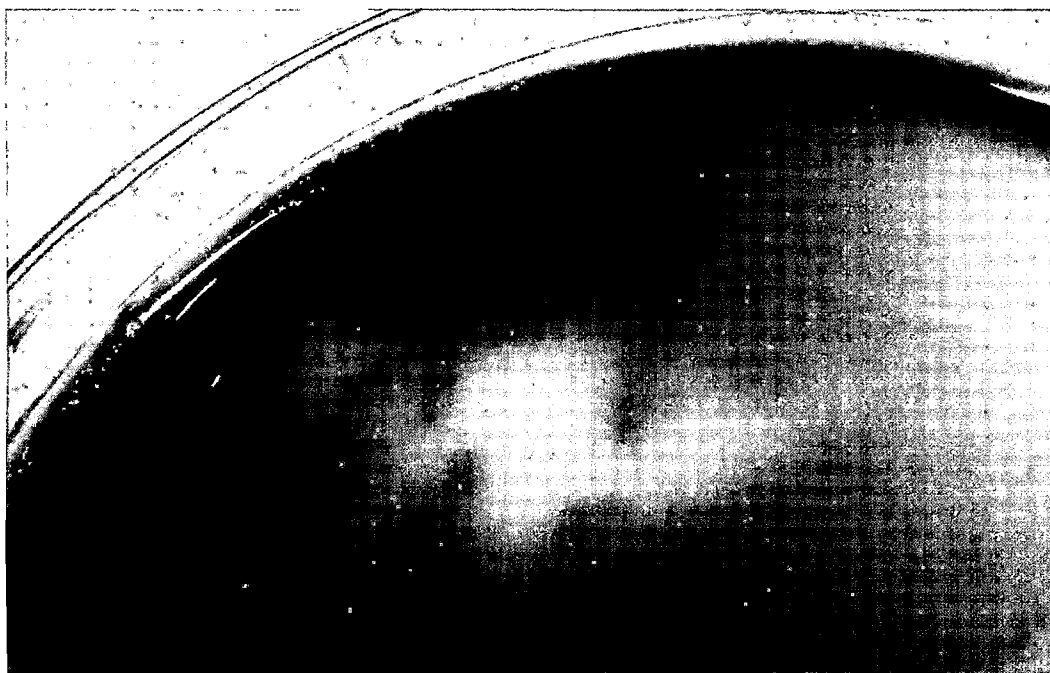
**Figura 26.** Tinción GRAM de la cepa de *L. monocytogenes*.



**Figura 27.** Prueba de Christie, Atkins y Munch-Peterson (CAMP) realizada a la cepa de *L. monocytogenes*.

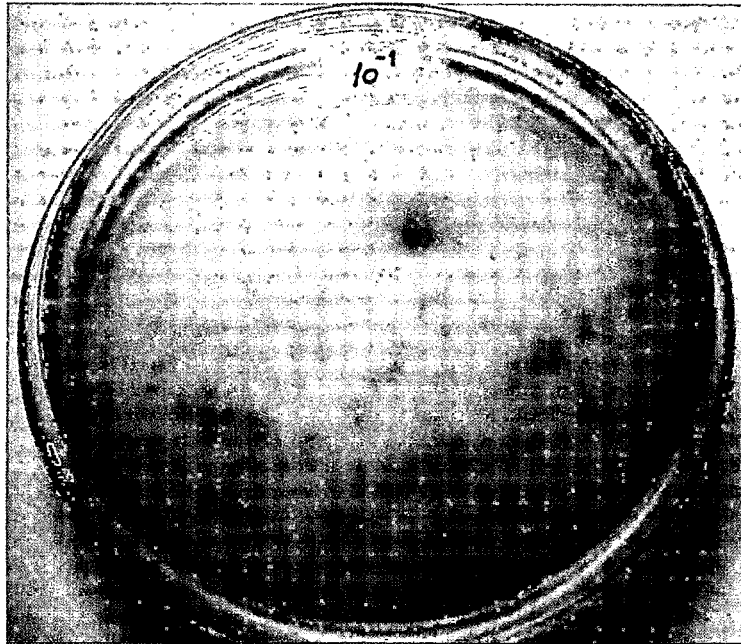


**Figura 28.** Crecimiento de *L. monocytogenes* en Agar Sangre incubado a 37°C durante 24 horas.

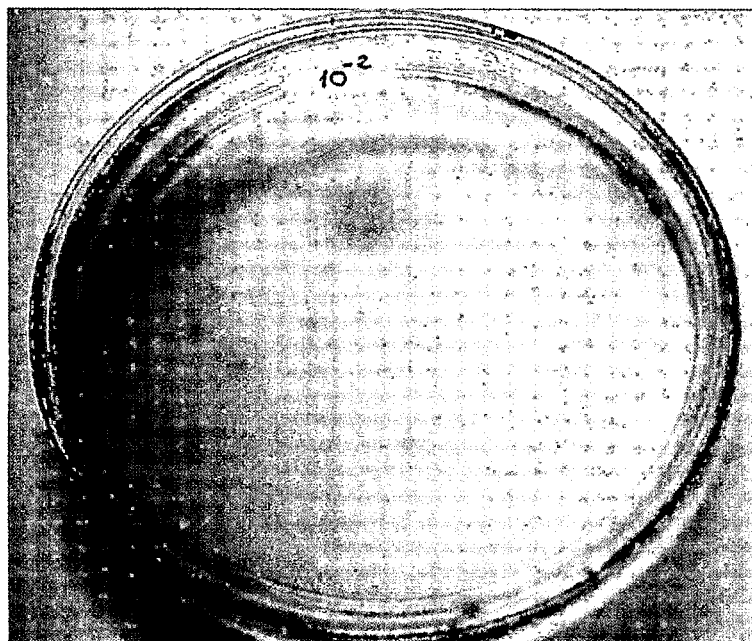


**Figura 29.** Visualización de las colonias de *L. monocytogenes* en Agar Oxford.

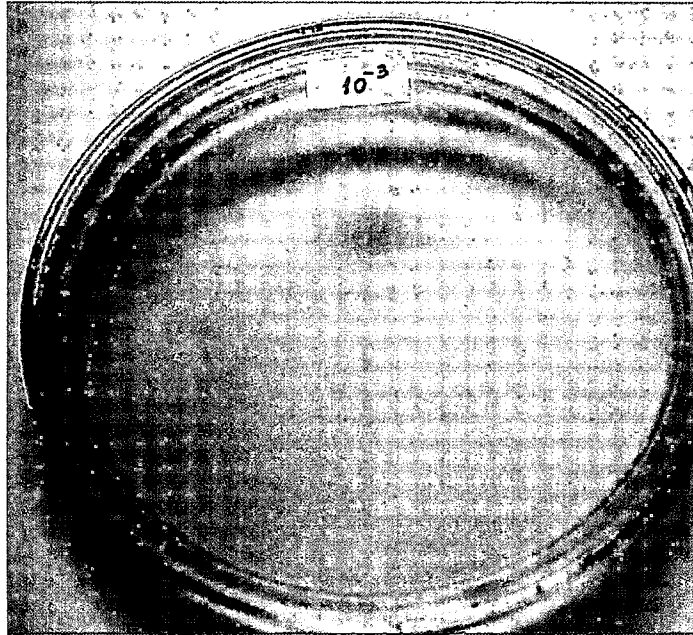




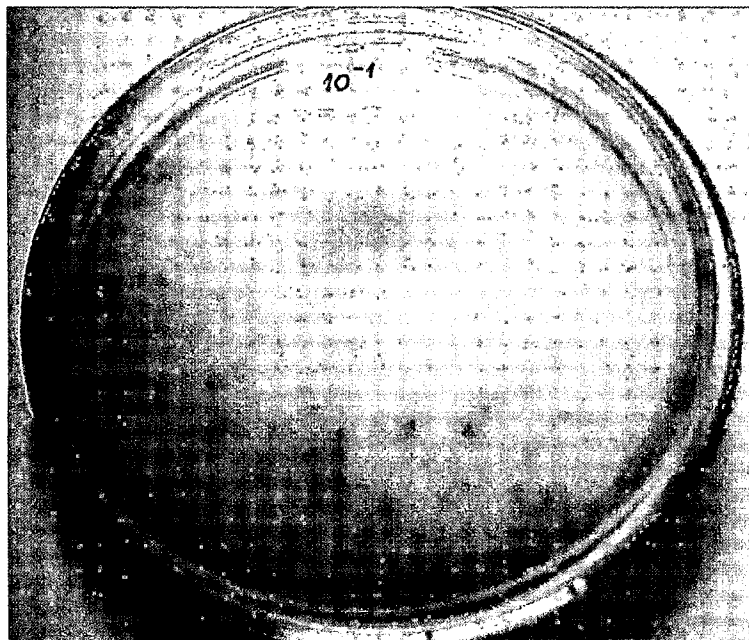
**Figura 30.** Crecimiento de la dilución  $10^{-1}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.



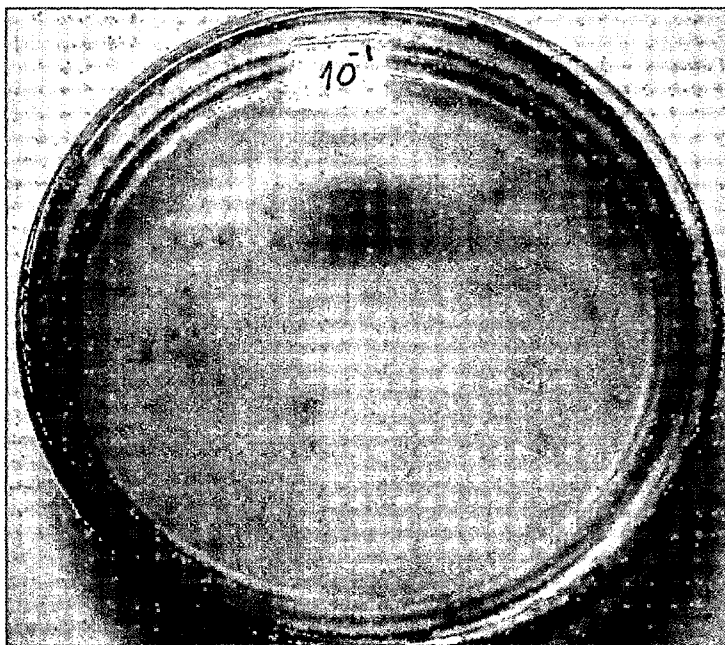
**Figura 31.** Crecimiento de la dilución  $10^{-2}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.



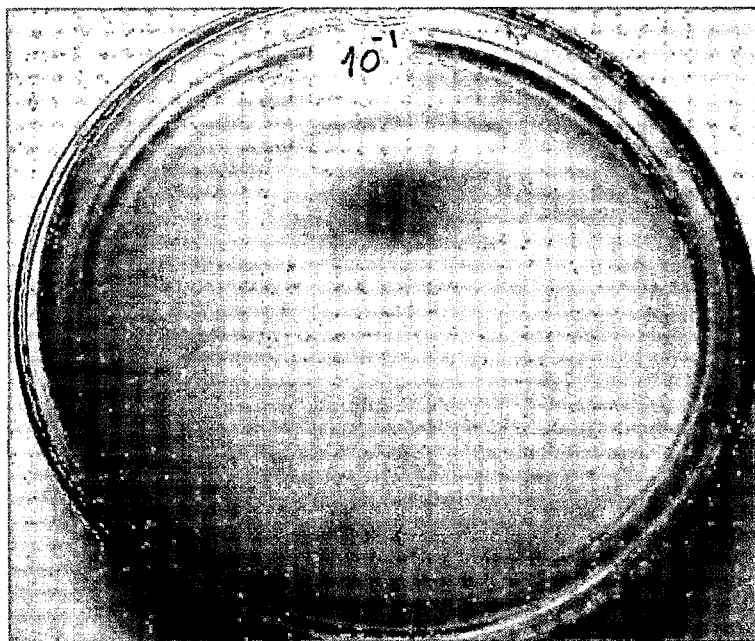
**Figura 32.** Crecimiento de la dilución  $10^{-3}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.



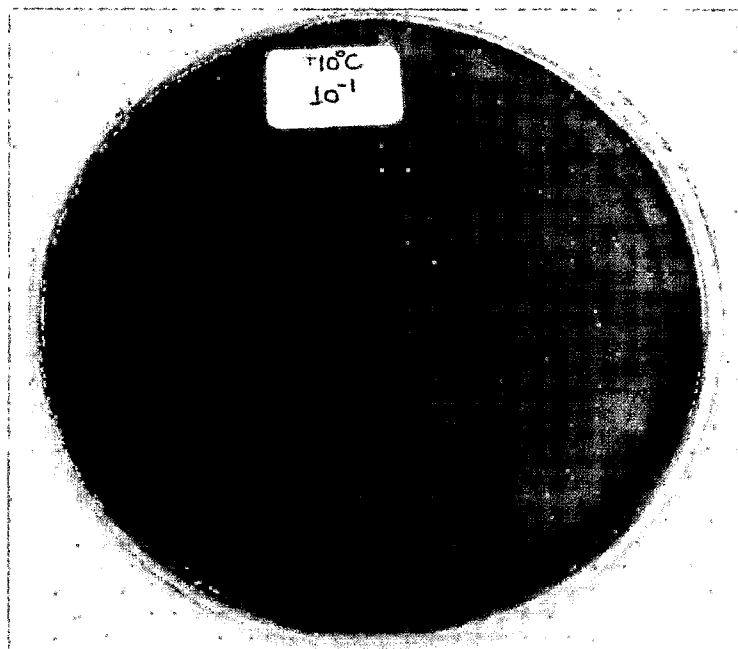
**Figura 33.** Crecimiento de la dilución  $10^{-1}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas.



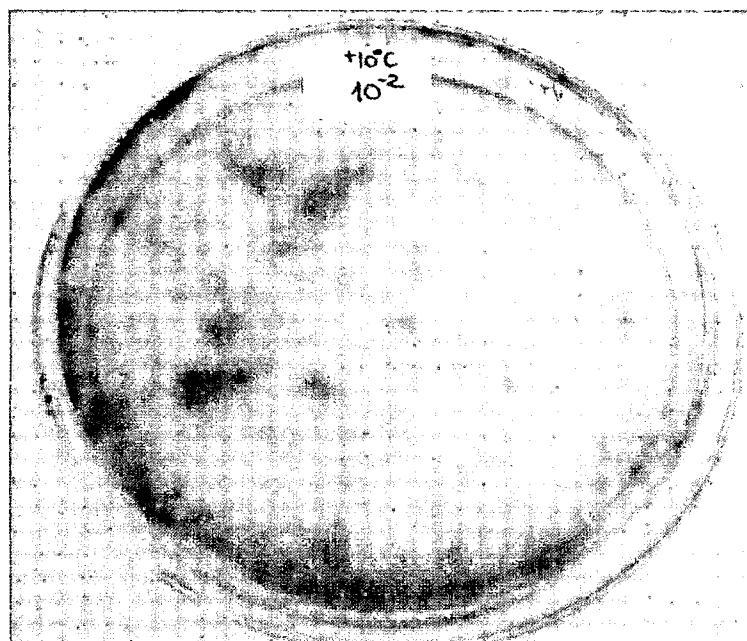
**Figura 34.** Crecimiento de la dilución  $10^{-1}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 72 horas.



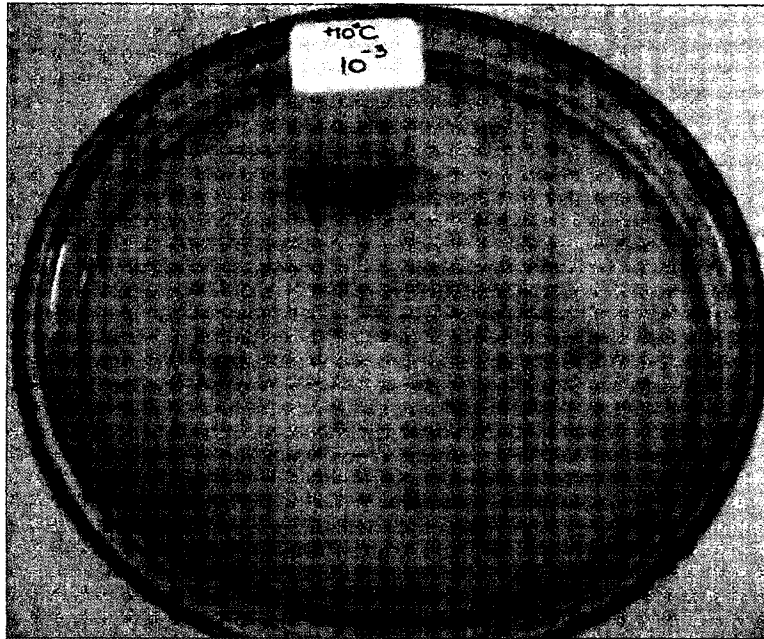
**Figura 35.** Crecimiento de la dilución  $10^{-1}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $-5^{\circ}\text{C}$  durante 96 horas.



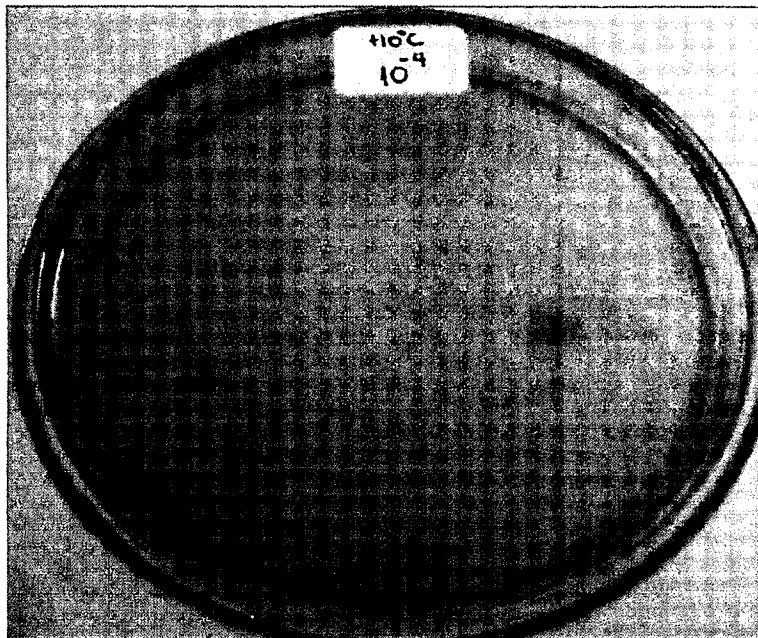
**Figura 36.** Crecimiento de la dilución  $10^{-1}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $10^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.



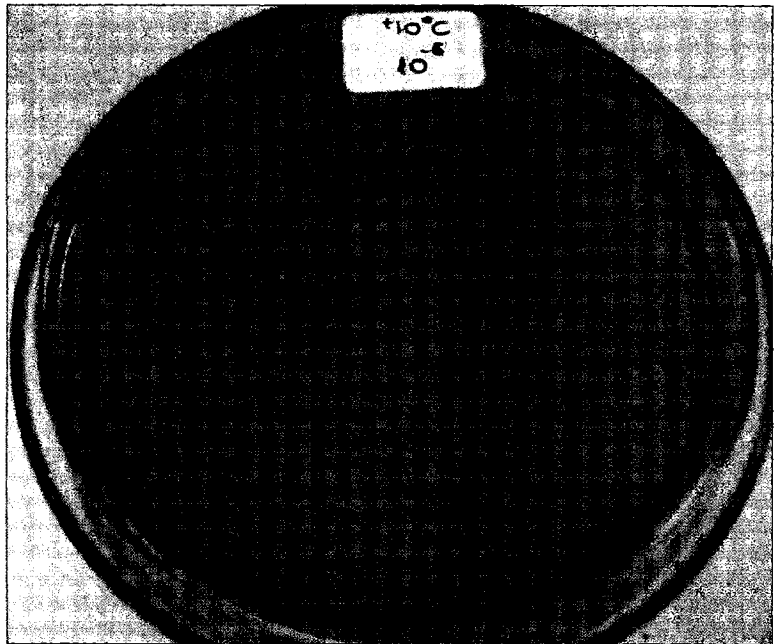
**Figura 37.** Crecimiento de la dilución  $10^{-2}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $10^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.



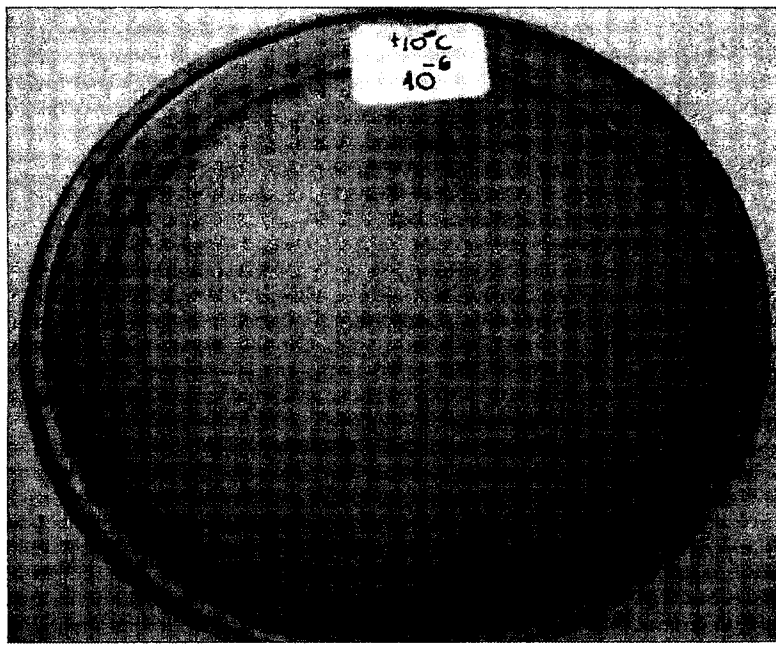
**Figura 38.** Crecimiento de la dilución  $10^{-3}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $10^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.



**Figura 39.** Crecimiento de la dilución  $10^{-4}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a  $10^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas.



**Figura 40.** Crecimiento de la dilución  $10^{-5}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a 10°C durante 24 horas.



**Figura 41.** Crecimiento de la dilución  $10^{-6}$  de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a 10°C durante 24 horas.

El crecimiento de *L. monocytogenes* en leche pasteurizada a -10, -5, 0, 5 y 10°C fue evaluado durante el tiempo determinado de 24, 48, 72 y 96 horas con sus respectivas repeticiones. Posteriormente se registró el promedio de los datos obtenidos del recuento en placa (Tabla 1, 2, 3, 4 y 5).

La ecuación de regresión lineal fue calculada para cada experimento realizado con sus respectivas repeticiones, acompañado de la curva de crecimiento lineal presentada por *L. monocytogenes* en cada caso. Según los datos calculados se obtuvieron los siguientes coeficientes de determinación: 0.4246 para la temperatura de -10°C (Figura 42), para la temperatura de -5°C se obtuvo como resultado 0.5132 (Figura 43), para la temperatura de 0°C correspondió 0.1662 (Figura 44), para la temperatura de 5°C se calculó 0.3716 (Figura 45) y, por último 0.8105 para la temperatura de 10°C (Figura 46); estableciendo la calidad de cada experimento para la repetición de los resultados.

Adicionalmente, se estableció el rango de crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a las temperaturas de -10, -5, 0, 5 y 10°C de acuerdo a el tiempo establecido de 24, 48, 72 y 96 horas (Tabla 6).

**Tabla 1.** Promedio de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición.

Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
-10°C	10 <sup>-1</sup>	24x10 <sup>1</sup>	21x10 <sup>1</sup>	17x10 <sup>1</sup>	11x10 <sup>1</sup>
-10°C	10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>2</sup>	0
-10°C	10 <sup>-3</sup>	0	0	0	0
-10°C	10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0
-10°C	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0
-10°C	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0

**Tabla 2.** Promedio de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -5°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición.

Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
-5°C	10 <sup>-1</sup>	111x10 <sup>1</sup>	93x10 <sup>1</sup>	82x10 <sup>1</sup>	38x10 <sup>1</sup>
-5°C	10 <sup>-2</sup>	16x10 <sup>2</sup>	3x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>2</sup>	0
-5°C	10 <sup>-3</sup>	3x10 <sup>3</sup>	0	0	0
-5°C	10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0
-5°C	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0
-5°C	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0



**Tabla 3.** Promedio de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 0°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición.

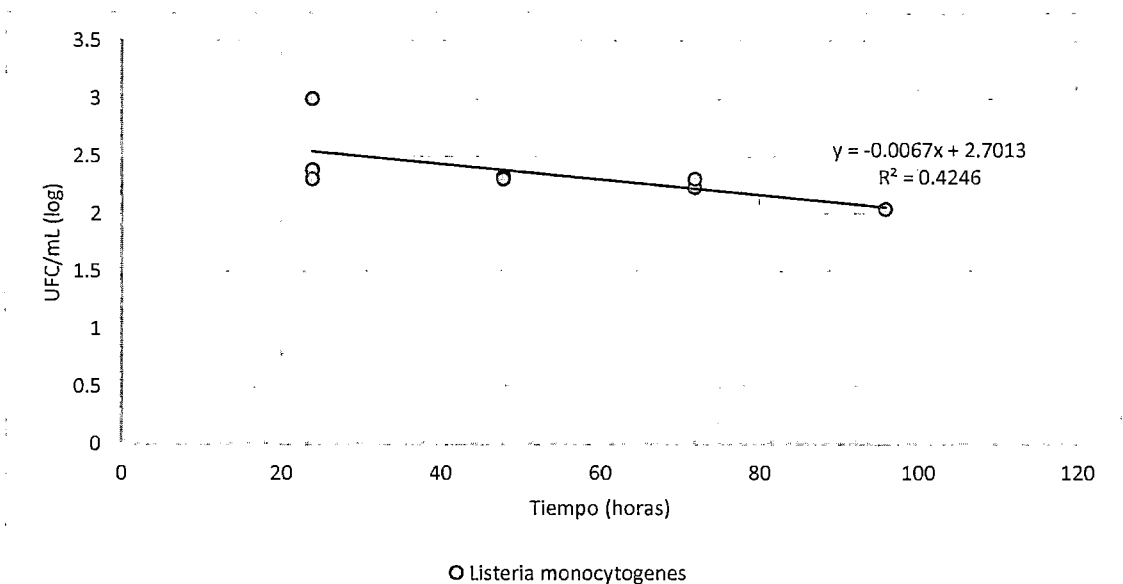
Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
0°C	10 <sup>-1</sup>	>300	>300	>300	>300
0°C	10 <sup>-2</sup>	48x10 <sup>2</sup>	106x10 <sup>2</sup>	60x10 <sup>2</sup>	75x10 <sup>2</sup>
0°C	10 <sup>-3</sup>	10x10 <sup>3</sup>	96x10 <sup>3</sup>	11x10 <sup>3</sup>	15x10 <sup>3</sup>
0°C	10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	4x10 <sup>4</sup>	7x10 <sup>4</sup>
0°C	10 <sup>-5</sup>	0	2x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>
0°C	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	1x10 <sup>6</sup>

**Tabla 4.** Promedio de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 5°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición.

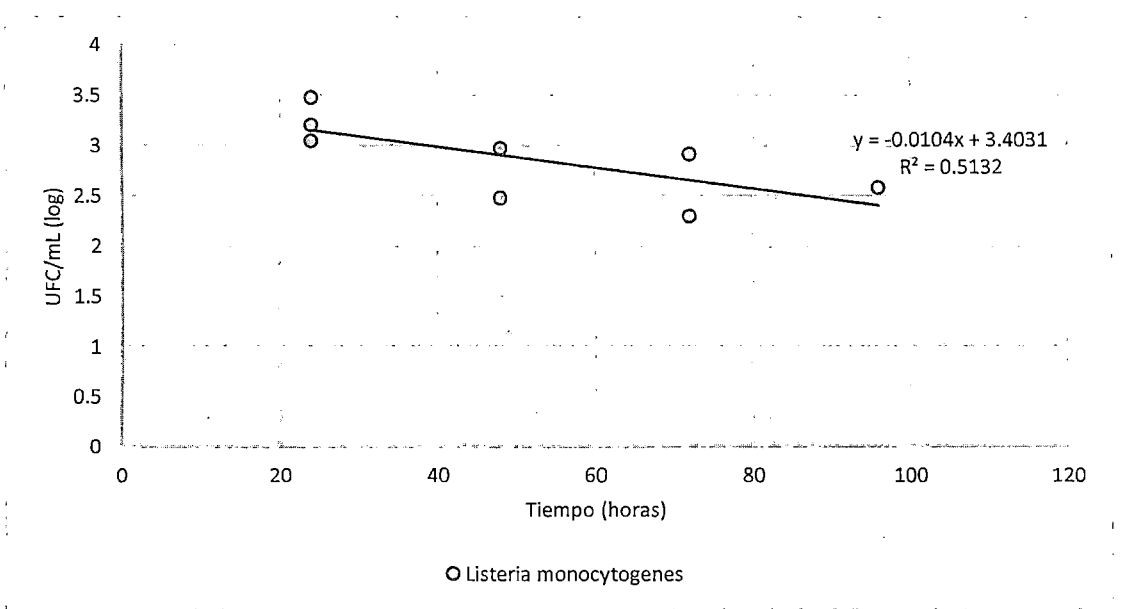
Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
5°C	10 <sup>-1</sup>	>300	>300	>300	>300
5°C	10 <sup>-2</sup>	155x10 <sup>2</sup>	>300	>300	>300
5°C	10 <sup>-3</sup>	41x10 <sup>3</sup>	125x10 <sup>3</sup>	223x10 <sup>3</sup>	290x10 <sup>3</sup>
5°C	10 <sup>-4</sup>	22x10 <sup>4</sup>	91x10 <sup>4</sup>	147x10 <sup>4</sup>	238x10 <sup>4</sup>
5°C	10 <sup>-5</sup>	8x10 <sup>5</sup>	21x10 <sup>5</sup>	41x10 <sup>5</sup>	89x10 <sup>5</sup>
5°C	10 <sup>-6</sup>	0	7x10 <sup>6</sup>	34x10 <sup>6</sup>	88x10 <sup>6</sup>

**Tabla 5.** Promedio de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición.

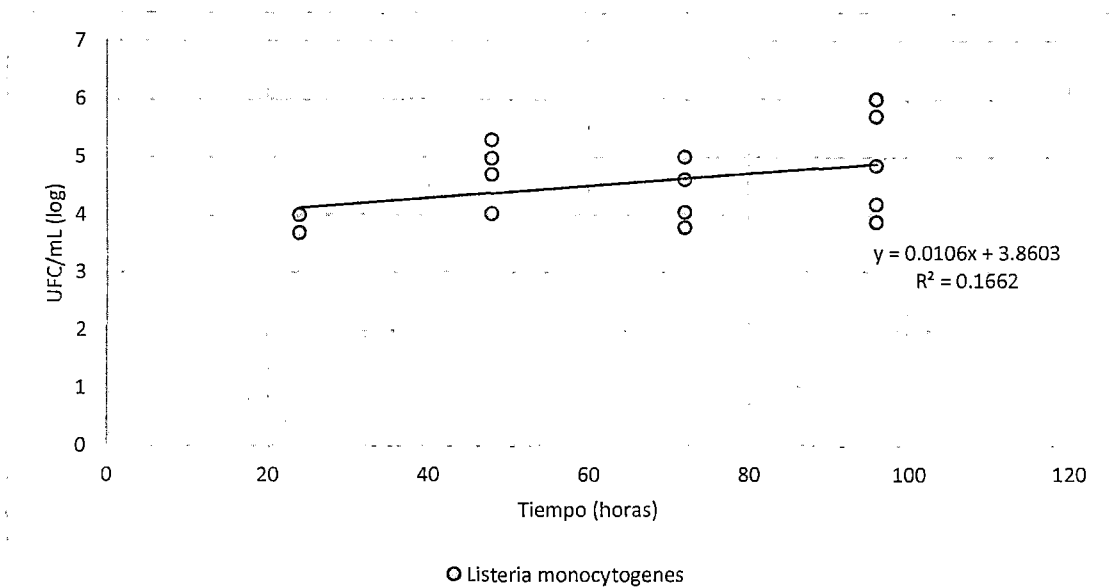
Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
10°C	10 <sup>-1</sup>	>300	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-2</sup>	>300	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-3</sup>	71x10 <sup>3</sup>	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-4</sup>	8x10 <sup>4</sup>	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-6</sup>	0	286x10 <sup>6</sup>	189x10 <sup>6</sup>	>300



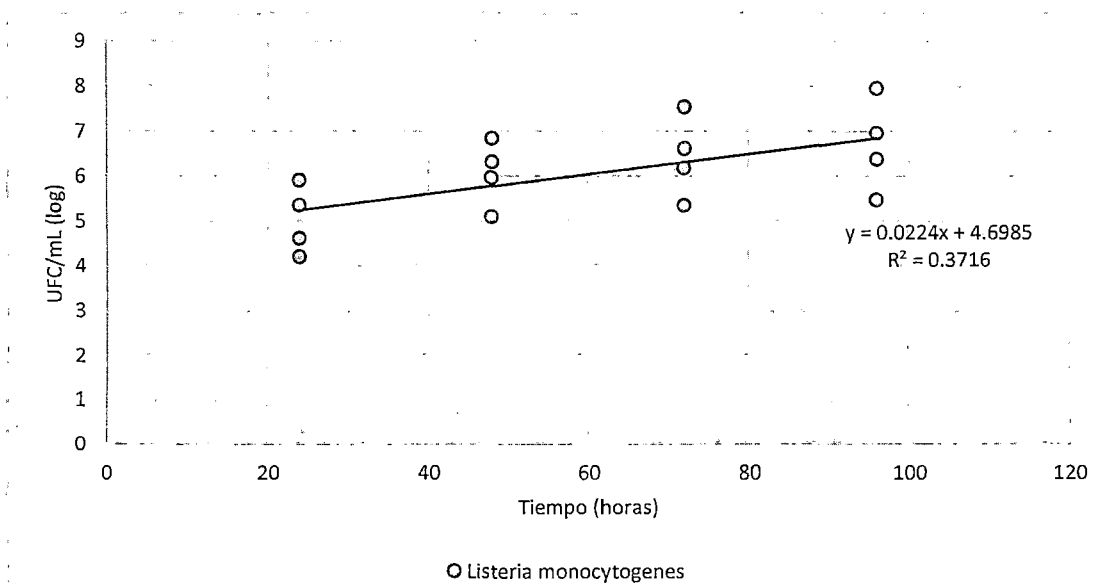
**Figura 42.** Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -10°C durante un tiempo determinado.



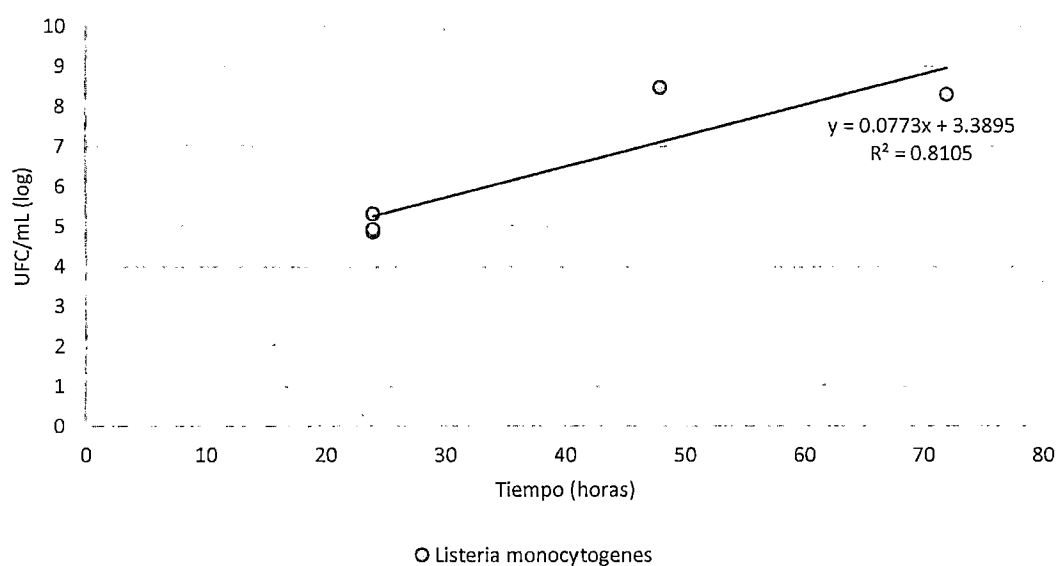
**Figura 43.** Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -5°C durante un tiempo determinado.



**Figura 45.** Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 0°C durante un tiempo determinado.



**Figura 44.** Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 5°C durante un tiempo determinado.



**Figura 46.** Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 10°C durante un tiempo determinado.

**Tabla 6.** Rango de crecimiento en UFC de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0, 5 y 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición.

Temperatura (°C)	Unidades formadoras de colonias (UFC)			
	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
<b>-10°C</b>	3-167	7-145	2-116	2-96
<b>-5°C</b>	1-27	1-28	1-26	6-22
<b>0°C</b>	1-66	1-119	1-68	1-80
<b>5°C</b>	8-203	7-195	13-298	45-284
<b>10°C</b>	0-101	224-289	124-299	Incontables

Posterior al registro de los resultados obtenidos para cada experimento, se seleccionaron los siguientes datos para el cálculo del número de reducción de ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* (Tabla 7).

La aplicación de la fórmula para hallar el número de reducción de ciclos logarítmicos permitió el conocimiento de los datos presentados (Tabla 8). Además, se obtuvo un coeficiente de determinación de 0.953 para -10°C, 0.6926 para -5°C, 0.1782 para 0°C y 0.9807 para 5°C (Figura 47).

En última instancia se procedió con el cálculo del tiempo de reducción decimal (D), haciendo uso de los datos presentados anteriormente (Tabla 7). A continuación se presentan los resultados para el tiempo de reducción decimal (D) de *L. monocytogenes* de acuerdo a la temperatura de exposición (Tabla 9).

Se obtuvo una curva de muerte de *L. monocytogenes* con un coeficiente de determinación de 0.9574 para -10°C y 0.9815 para -5°C de acuerdo al tiempo de reducción decimal calculado (Figura 48).

El porcentaje de reducción decimal para el tiempo de incubación de *L. monocytogenes* establecido en el estudio es calculado para las temperaturas de -10 y -5°C (Tabla 10).

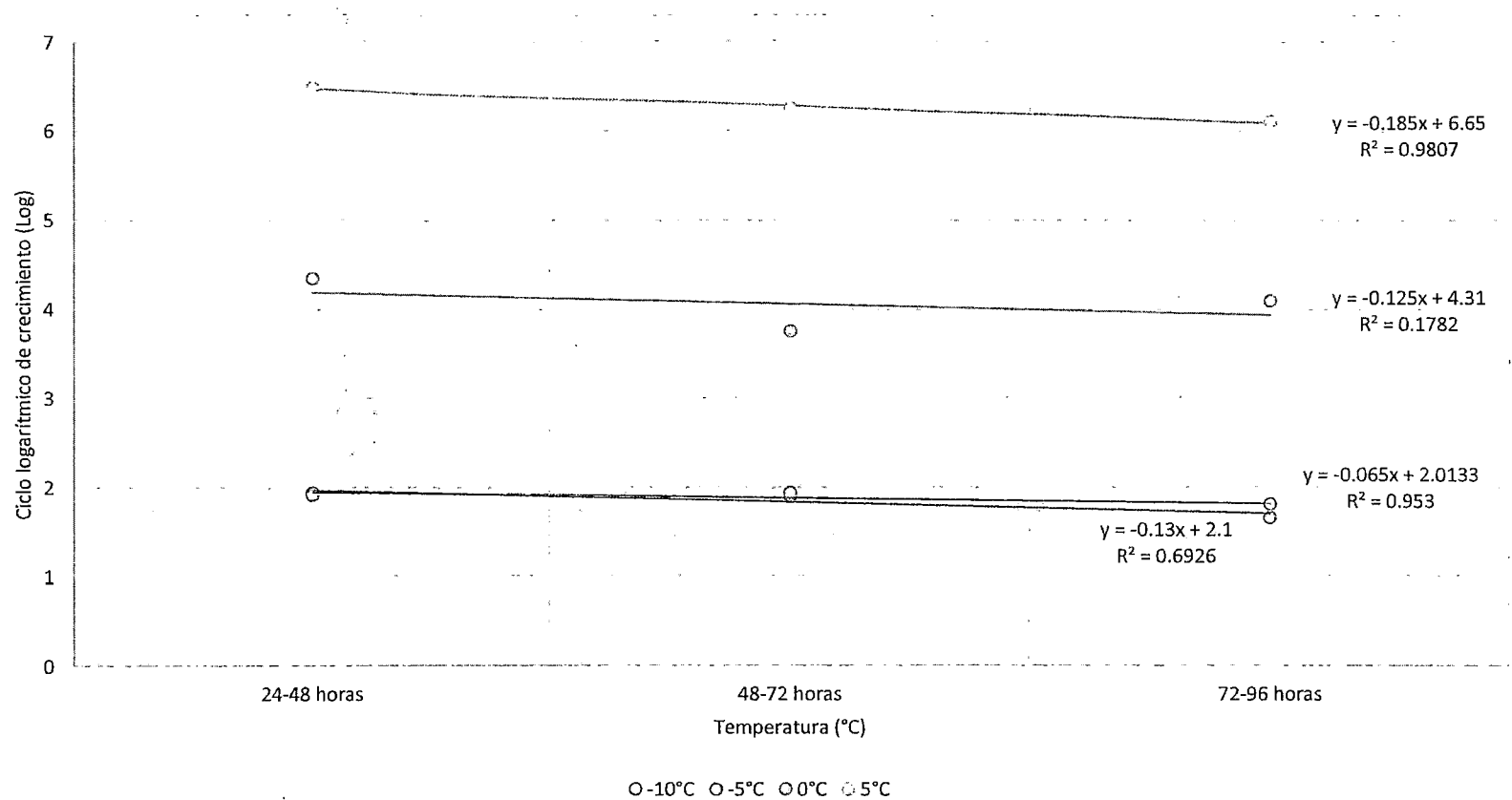
**Tabla 7.** Número de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0, 5 y10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición y una dilución representativa.

Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
-10°C	10 <sup>-1</sup>	24x10	21x10	17x10	11x10
-5°C	10 <sup>-1</sup>	111x10	93x10	82x10	38x10
0°C	10 <sup>-2</sup>	48x10 <sup>2</sup>	106x10 <sup>2</sup>	60x10 <sup>2</sup>	75x10 <sup>2</sup>
5°C	10 <sup>-3</sup>	41x10 <sup>3</sup>	125x10 <sup>3</sup>	223x10 <sup>3</sup>	290x10 <sup>3</sup>
10°C	10 <sup>-6</sup>	0	286x10 <sup>6</sup>	189x10 <sup>6</sup>	>300

**Tabla 8.** Número de reducción de ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0, 5 y10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición y una dilución representativa.

Temperatura (°C)	Dilución	Ciclos logarítmicos de crecimiento		
		24 horas-48 horas	48 horas-72 horas	72 horas-96 horas
-10°C	10 <sup>-1</sup>	1.94log	1.90log	1.81log
-5°C	10 <sup>-1</sup>	1.92log	1.94log	1.66log
0°C	10 <sup>-2</sup>	4.34log	3.75log	4.09log
5°C	10 <sup>-3</sup>	6.48log	6.25log	6.11log
10°C	10 <sup>-6</sup>	Indeterminado	11.82log	Indeterminado





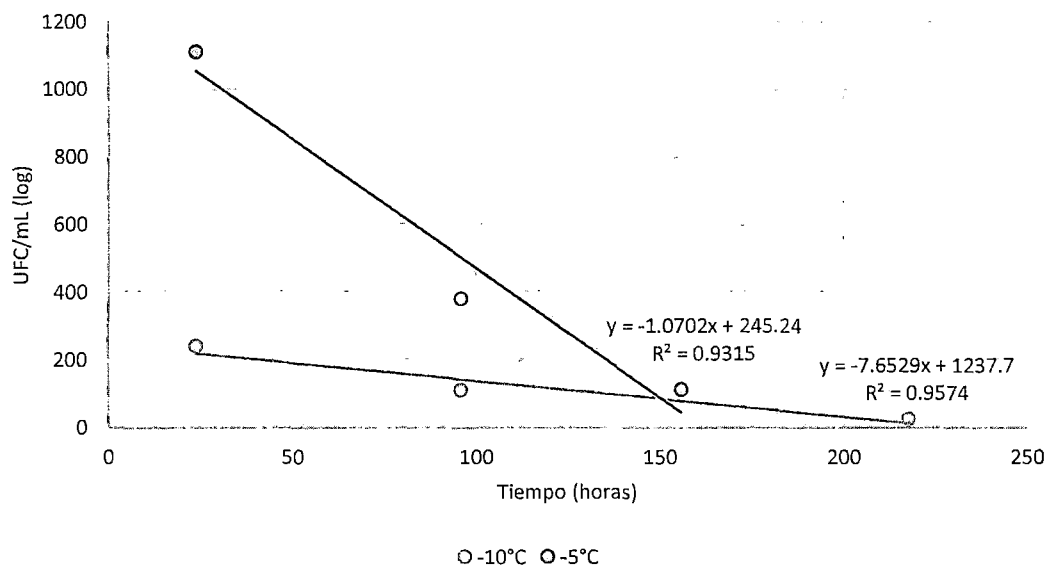
**Figura 47.** Curva de crecimiento de *L. monocytogenes* según el número de reducción de ciclos logarítmicos, inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0 y 5°C durante un tiempo determinado.

**Tabla 9.** Tiempo de reducción decimal (D) de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10, -5, 0, 5 y 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición y una dilución representativa.

Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)		Valor D (Horas)
		24 horas	96 horas	
-10°C	10 <sup>-1</sup>	24x10	11x10	218
-5°C	10 <sup>-1</sup>	111x10	38x10	156
0°C	10 <sup>-2</sup>	48x10 <sup>2</sup>	75x10 <sup>2</sup>	Indeterminado
5°C	10 <sup>-3</sup>	41x10 <sup>3</sup>	290x10 <sup>3</sup>	Indeterminado
10°C	10 <sup>-6</sup>	0	>300	Indeterminado

**Tabla 10.** Porcentaje de reducción decimal para el valor D y el tiempo de exposición establecido de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10 y -5°C, teniendo en cuenta una dilución representativa.

Temperatura (°C)	Reducción decimal (%)	
	Valor D	24-96 horas
-10°C	90%	29%
-5°C	90%	41%



**Figura 48.** Curva de muerte de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a temperaturas de -10 y -5°C, teniendo en cuenta el valor D<sub>-10</sub> y D<sub>-5</sub>, el tiempo de exposición y una dilución representativa.

## V. DISCUSIÓN

El incremento en los últimos años de brotes de listeriosis y su asociación con el consumo de alimentos listos para el consumo (LPC) como los productos lácteos han incentivado la realización de diversos estudios para una mejor vigilancia y control.

Los datos reportados en este estudio representan una base en el conocimiento del efecto del tiempo y bajas temperaturas en *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada dado que no se encontraron investigaciones relacionadas en la Región Lambayeque; así mismo a nivel nacional y mundial son escasas las publicaciones al respecto.

Los medios de cultivo empleados representan una gran influencia en los resultados obtenidos y deben ser tomados en cuenta. El caldo de enriquecimiento para *Listeria* según Fraser utilizado en la recuperación, preparación del inóculo y en las diluciones de *L. monocytogenes* ha demostrado ser muy conveniente dado que es un medio de cultivo rico en extracto de levadura y por consiguiente ofrece un ambiente óptimo para el crecimiento de dicho microorganismo; teniendo en cuenta

lo descrito por Frazier & Westhoff (1993) que mientras más rico es el medio de crecimiento más termoresistentes son las células vegetativas o esporas. Diversos autores coinciden en el empleo de este medio de cultivo (Estrada & Zavaleta, 2004; Chávez & Arias, 2009; Pérez & Chávez, 2011; Barón *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2012), caso contrario con Barker & Park (2001); Villalobos & Martínez (2006); Ramírez *et al.* (2009); Cruz *et al.* (2012) y Sharifi & Moshtaghi (2014) hicieron uso de caldo tripticasa de soya así mismo otros autores sugieren el uso de Caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI) (Huertas *et al.*, 2008, Rodríguez & Manca de Nadra, 2009; Molina *et al.*, 2009).

El agar Oxford es uno de los medios de cultivo establecidos para el aislamiento de *L. monocytogenes* (Food and Drug Administration, FDA & Bacteriological Analytical Manual, BAM, 2011) además es efectivo en su recuperación, razón por la cual ha sido utilizado por Flessa *et al.*, 2004, Cruz *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2013 y Vega & Mercado, 2013. Otro medio de cultivo normalizado es el agar PALCAM y considerado por muchos investigadores como un medio de cultivo más adecuado en cuanto al color y tamaño de las colonias típicas (Rodríguez & Manca de Nadra, 2009, Ramírez *et al.*, 2009). Realmente los laboratorios de alimentos utilizan ambos medios de cultivo con el fin de garantizar una mayor recuperación de la especie (Villalobos & Martínez, 2006; Rodríguez *et al.*, 2009; Estrada & Zavaleta, 2004, Chaves & Arias, 2009; Barón *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2012).

Se debe tener en cuenta que el uso de un medio selectivo en la recuperación de *L. monocytogenes* después de exponerla a condiciones desfavorables como las bajas temperaturas induce un estrés añadido cometiéndose injuria bacteriana y en consecuencia se observa una recuperación variable del microorganismo (Doyle, 2001). En agar no selectivo, las células dañadas son capaces de reparar el daño inducido por el estrés y son capaces de crecer, lo cual supone la razón principal del empleo de Agar tripticasa soya suplementado con 0,6% de extracto de levadura (TSAYE) como medio alternativo de recuperación de *L. monocytogenes* (Villalobos & Martínez, 2006; Barón *et al.*, 2012; Ramírez *et al.*, 2009).

Por otro lado, la temperatura de incubación para el inóculo es determinante dado que afecta la biosíntesis de lípidos, la composición de las membranas, así como la síntesis de proteínas (Sergelidis & Abraham, 2009), siendo más resistentes las cepas que se cultivan a temperaturas altas (Gill & Holley, 2004), es por ello que en el presente estudio se trabajó con la temperatura de 37°C que favorece la termoresistencia de las especies de *Listeria* según Molina *et al.* (2009).

La incidencia de contaminación de *L. monocytogenes* en leche pasteurizada es 21,4% (Fernández *et al.*, 1986) siendo un porcentaje inesperado por muchos investigadores que la consideraban como un producto seguro para el consumo y que ahora conlleva el mismo peligro que la leche cruda. Si bien dicho microorganismo resiste temperaturas tanto altas como bajas su presencia en leche pasteurizada también sugiere una mala manipulación del producto después de la pasteurización tal como se ha comprobado la contaminación durante los procesos de llenado y empaquetado (Doyle, 2001).

La medida de control más usada por la población para evitar enfermedades transmitidas por los alimentos es el calentamiento pero en *L. monocytogenes* no es eficiente dado que en los últimos años ha adquirido una gran termoresistencia a temperaturas altas de 73-76°C por un tiempo de 5 a 15 minutos (Doyle *et al.*, 1987; Bunning *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 2009) y su previa refrigeración solamente contribuye a su termoresistencia. El control de *L. monocytogenes* a bajas temperaturas es más conveniente porque ocasiona una disminución en la velocidad de crecimiento y normalmente presenta un tiempo prolongado de exposición que garantiza una reducción del número de células presentes.

El conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) para las temperaturas de 0, 5 y 10°C en algunos casos señaló un número de colonias considerado como "mayor a 300 UFC (>300)"; estos datos no fueron considerados para la presentación de los resultados.

Para las temperaturas de -10, -5 y 0°C se observó poco crecimiento de *L. monocytogenes* y en consecuencia el número de unidades formadoras de colonias para algunas diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$ ) fue menor a 30 UFC; se registraron estos datos dado que representan un crecimiento significativo.

Se observó que el número de UFC de las placas correspondientes a las primeras diluciones ( $10^{-1}$  y  $10^{-2}$ ) presentaron un crecimiento exhaustivo por toda la placa razón por la cual fueron separadas del análisis y consideradas como "incontables" a las 48, 72 y 96 horas de exposición a 5 y 10°C.

La investigación realizada permitió registrar datos de crecimiento muy variables. El efecto de las temperaturas de 5 y 10°C fue positivo en el crecimiento de *L. monocytogenes* en leche pasteurizada, desde las primeras 24 horas hasta las 96 horas se evidenció un rápido crecimiento de la bacteria desde concentraciones mínimas de  $156 \times 10^3$  UFC/mL y  $2 \times 10^4$  UFC/mL, respectivamente para las temperaturas de 5 y 10°C; hasta concentraciones altas de  $186 \times 10^6$  UFC/mL a 5°C y  $299 \times 10^6$  UFC/mL a 10°C (Anexo 7, Anexo 6).

Las temperaturas de 5 y 10°C en función de UFC/mL no demostraron un control en el crecimiento de *L. monocytogenes* después de 4 días de exposición en leche pasteurizada así mismo Figuera *et al.* (2005) observaron un crecimiento acentuado de *L. monocytogenes* en preparados de atún almacenados a 6°C, y Gandhi & Chickindas (2007) en huevos tratados con hipoclorito de sodio después de 90 días a 5°C y más de 14 días a 10°C; contrastando con lo establecido en Flessa *et al.* (2004) sobre la improbabilidad de crecimiento de microorganismos patógenos a temperaturas de almacenamiento de 10°C o menos. Es probable que si se aumenta el tiempo de exposición para estas temperaturas entonces el número de células se reduzca según los datos registrados en fresas intactas después de 4 a 7 días conservadas a 4°C (Flessa *et al.*, 2004), en naranjas almacenadas a 4 y 8°C (Pao *et al.*, 1998) y en tomates almacenados a 10°C (Beuchat & Brackett, 1991).

El crecimiento de *L. monocytogenes* mantenida a una temperatura de 0°C fue inconstante, se obtuvo una concentración máxima de  $10^6$  UFC/mL de dicho microorganismo a las 72 y 96 horas de incubación (Anexo 8).

El comportamiento del crecimiento a 0°C fue heterogéneo demostrando el proceso de adaptación del microorganismo al medio (Anexo 10), oponiéndose a el estudio realizado por Walker *et al.* (1990) quienes establecieron que a 0°C el crecimiento era mucho más lento pero se inhibía. No se encuentran investigaciones de referencia disponibles que expliquen este comportamiento pero una posible respuesta se encuentra en los componentes de la leche. *L. monocytogenes* es un microorganismo proteolítico que produce lipasas extracelulares, fosfolipasas y otras enzimas hidrolíticas pero es incapaz de aprovechar la lactosa (Doyle, 2001), en compensación utiliza la caseína, las sales minerales, vitaminas y la ausencia de microflora acompañante para su desarrollo y estabilidad; los inhibidores naturales de la leche como el sistema lactoperoxidasa es inactivado parcialmente después de la pasteurización y la lactoferrina es limitada por el citrato en la competencia de unión al hierro favoreciendo su crecimiento.

La exposición a temperaturas bajo 0°C presenta un mayor control en el crecimiento de *L. monocytogenes*. La concentración más alta fue de  $1 \times 10^3$  UFC/mL y la concentración más baja fue  $6 \times 10$  UFC/mL para la temperatura de -10°C (Anexo 10); a la temperatura de -5°C correspondió  $3 \times 10^3$  UFC/mL y  $12 \times 10$  UFC/mL como la concentración más alta y baja respectivamente (Anexo 9); denotando la supervivencia de dicha bacteria ante estas temperaturas, según lo establecido por AESAN (2011) que expone el límite inferior de crecimiento es de -1,5 a 3°C con capacidad de sobrevivir hasta -18°C sin presentar un crecimiento.

La escasez de trabajos de investigación respecto a *L. monocytogenes* y su exposición a temperaturas bajo 0°C tuvo como consecuencia que los datos obtenidos en el presente estudio para las temperaturas de -5 y -10°C no fueran comparados y discutidos a profundidad.



Con respecto a la reducción de ciclos logarítmicos se obtuvo que la temperatura de 10°C no indicaba una reducción en el crecimiento confirmando su deficiencia en el control de *L. monocytogenes*. Por otro lado, fue posible esclarecer que la temperatura de 5°C sí debe ser considerada en el control de esta bacteria por presentar reducciones de ciclos logarítmicos de 6,48, 6,25 y 6,11log UFC/mL para períodos de tiempo desde 24-48, 48-72 y 72-96 horas, tal como señala Ozdemir *et al.* (2006) con 1,12, 1,14, 2,16log UFC/g para el primero, segundo y tercer día de incubación a 4°C en carne de res adicionada con ácido láctico al 1% y Mytle *et al.* (2006) observaron reducción en el número de ciclos logarítmicos donde *L. monocytogenes* crece 1,0 log UFC/g a 5°C en 14 días en carne de pollo. No obstante el sustrato influye en la reducción de ciclos logarítmicos demostrado en el estudio de Rodríguez & Manca de Nadra (2009) donde a 4°C la bacteria crece en carne de pescado incrementando 0,60log UFC/g el número de células al final de la incubación.

La temperatura de 0°C presentó una reducción de ciclos logarítmicos que fue seguida de una recuperación de acuerdo a lo anteriormente expuesto. Las temperaturas con un mejor control sobre *L. monocytogenes* continúan siendo -5 y -10°C al presentar ambas una reducción máxima de 1,94log UFC/mL en un tiempo de 48-72 y 24-48 horas, respectivamente. Desafortunadamente no existen registros del crecimiento de dicho microorganismo a estas temperaturas pero se concluye que la reducción de ciclos logarítmicos a temperaturas bajo 0°C es mayor que a temperaturas superiores a 0°C.

Adicionalmente se implementó el valor D para las temperaturas que presentan un mejor control de *L. monocytogenes* a bajas temperaturas, el tiempo de reducción decimal fue de 218 horas para -10°C y 156 horas para -5°C, dejando en claro que la temperatura óptima para el control de *L. monocytogenes* en leche pasteurizada es -10°C para el tiempo determinado en el estudio de 4 días (24, 48, 72 y 96 horas) en función de UFC/mL, sin embargo con el cálculo del valor D se debería tener en cuenta que la temperatura de -5°C es competente en el control de dicha bacteria,

presentando una reducción del 41% de dicho microorganismo; si se requiere una reducción del 90% del microorganismo entonces se debe exponer a un tiempo mayor a 6 días.

La fórmula para determinar el tiempo de reducción decimal (D) no pudo ser aplicada a las temperaturas de 0, 5 y 10°C debido a los períodos de reducción y aumento en los ciclos logarítmicos de *L. monocytogenes* que éstos presentan.

La resistencia de *L. monocytogenes* a bajas temperaturas probablemente sea posible por la presencia de un sistema de proteínas que se activan frente al cambio brusco de temperatura (Espinoza *et al.*, 2004) y su exposición por largos períodos de tiempo.

## VI. CONCLUSIONES

- Se multiplicó a *L. monocytogenes* a una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL.
- A una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  y un tiempo de 96 horas se controló el crecimiento de *L. monocytogenes* a una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL.
- El cálculo del valor D determinó que la temperatura de  $-5^{\circ}\text{C}$  presentó una mejor eliminación del microorganismo.

## VII. RECOMENDACIONES

- Exponer a *L. monocytogenes* a diferentes condiciones adversas de crecimiento tal como pH bajo, altas temperaturas y altas concentraciones de NaCl.
- Realizar investigaciones dirigidas al daño subletal producido por la congelación en cepas de *Listeria monocytogenes*.
- Emplear el agar Oxford suplementado en futuras investigaciones con *L. monocytogenes*.
- Utilizar otros sustratos alimenticios para la inoculación de *L. monocytogenes*, como frutas y verduras.
- Estudiar la resistencia bacteriana con distintas cepas de *L. monocytogenes*.

## VIII. RESUMEN

La resistencia de *L. monocytogenes* a bajas temperaturas en alimentos listos para el consumo como la leche representa un riesgo potencial de enfermedad para los consumidores por ser causante de listeriosis, enfermedad que causa meningitis y sepsis en aquellas personas con un sistema inmune deprimido así como aborto en mujeres embarazadas. Debido a ello el objetivo del presente estudio fue determinar el efecto de bajas temperaturas y tiempo en el control de *L. monocytogenes* a una concentración aproximada de  $10^6$  UFC/mL inoculada en leche pasteurizada. El estudio inició con el aislamiento y confirmación de la cepa de *L. monocytogenes* para posteriormente preparar el inóculo haciendo uso del caldo de enriquecimiento selectivo para *Listeria* según Fraser. Después de la inoculación de *L. monocytogenes* en leche pasteurizada se incubó a temperaturas bajas (-10, -5, 0, 5 y 10°C) por un tiempo establecido (24, 48, 72 y 96 horas) para determinar el efecto de las bajas temperaturas y el tiempo mediante la técnica de recuento en placa por profundidad haciendo uso de Agar Oxford. De acuerdo a los resultados obtenidos se concluyó que a una temperatura de -10°C y un tiempo de 96 horas se controló el crecimiento de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada, presentando  $1 \times 10^3$  UFC/mL y  $8 \times 10$  UFC/mL como la concentración más alta y baja del microorganismo respectivamente, una reducción logarítmica hasta 1,94log UFC/mL y un tiempo de reducción decimal de 218 horas. Se debe tener en cuenta que dicha investigación presenta medidas de control para *L. monocytogenes* en función del tiempo y la temperatura, no garantiza la eliminación total de dicho microorganismo.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, AESAN. (2011). Estudios de vida útil para *L. monocytogenes* en determinados productos alimenticios. *Revista del Comité Científico*, 14(3), 43-59.
- Aguado, G., Faggian, F. & Jiménez, M. (2006). *Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid - España: Editorial Médica Panamericana.
- Allen, S. & Koneman, E. (2008). Bacilos grampositivos aerobios facultativos. Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas. 6ª Edición. España: Editorial Médica Panamericana S.A.
- Augustin, J. & Czarnecka-Kwasiborski, A. (2012). Single cell growth probability of *Listeria monocytogenes* at sub optimal temperature, pH, and water activity. Recuperado de: <http://www.frontiersin.org/Microbiology>
- Augustin, J., Zuliani, V., Cornu, M & Guiller, L. (2005). Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 99(1), 1019-1042.
- Barker, C. & Park, S. (2001). Sensitization of *Listeria monocytogenes* to Low pH, Organic Acids, and Osmotic Stress by Ethanol. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 67(4), 1594-1600.
- Barón, J., Chávez, M & Saucedo, E. (2012). *Listeria monocytogenes* en jugos de frutas frescas como vehículos de transmisión de listeriosis humana. *Revista "Ciencia y Tecnología"*, 9(2).
- Beuchat, L. & Brackett, R. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* inoculated into raw tomatoes and processed tomato products. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 57(1), 1367-1371.
- Beuchat, L., Brackett, R. & Doyle, M. (1994). Lethality of carrot juice to *Listeria monocytogenes* as affected by pH, sodium chloride and temperature. *Journal of Food Protection*, 57(1), 470-474.
- Brackett, R. (1988). Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Journal of Food Technology*, 42(4), 162-164.
- Brock, T., Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (2003). *Biología de los microorganismos*. 10ª Edición. Madrid - España: Editorial Pearson Prentice Hall.

- Bunning, V., Crawford, R., Tierney, J. & Peeler, J. (1992). Thermotolerance of Heat-Shocked *Listeria monocytogenes* in Milk Exposed to High-Temperature, Short-Time Pasteurization. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 58(6), 2096-2098.
- 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 Licenciatura). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima- Perú.
- Chaves, C. & Arias, M. (2009). Caracterización de cepas de *Listeria monocytogenes* realizados a partir de queso fresco proveniente de diferentes zonas productoras costarricenses. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(1).
- Comisión para la Promoción de la Pequeña y Micro Empresa, PROMPYME. (2007). Manual de Buenas Prácticas de Manipulación. Ministerio de Trabajo y Promoción del Empleo, Lima-Perú.
- Cruz, W., Rivera, G., Ávila, S., Cantú, R., Garza, E., Sierra, G., Téllez, S. & Bocanegra, V. (2012). *Listeria sp* y *Listeria monocytogenes* en pollo congelado: Detección por NOM-143-SSA1-1995 y PCR de expendios comerciales de Matamoros y Reynosa, Tamaulipas, México. *Revista Ciencia UAT (Universidad Autónoma de Tamaulipas)*, 23(1), 41-47.
- David, W., Fleming, M., Stephen, L., Cochi, M., Kristine, L., MacDonald, M., Jack, D., Peggy, S., Hayes, B., Brian, D., Plikaytis, M., Marion, B., Holmes, B., Audurier, D., Claire, V., Broome, M., Arthur, L. & Rein gold, M. (1985). Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *The New England Journal of Medicine*, 312(1), 404-407.
- Díaz, 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"*, 9(2).
- Doyle, M. (1988). Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Technology*, 42(4), 169-171.
- Doyle, M. (2001). Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. Recuperado de: <http://fri.wisc.edu/docs/pdf/virulencelmono.pdf>
- Doyle, M., Glass, K., Beery, J., García, G., Pollard, D. & Schultz, R. (1987). Survival of *Listeria monocytogenes* in Milk during High-Temperature,

- Short-Time Pasteurization. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 53(7), 1433-1438.
- Espinoza, A., De la Torre, M., Salinas, M. & Sánchez, V. (2004). Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados de los distritos de Ica, Enero-Marzo, 2003. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 21(1), 71-75.
- Estrada, O. & Zavaleta, A. (2004). Genotipificación de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de leche cruda de diferentes ganaderías de Lima mediante el ADN polimórfico amplificado al azar. *Revista Ciencia e Investigación*, 7(3).
- Fernández, J., Dominguez, L., Vasquez, J., Rodriguez, E., Briones, V., Blanco, J. & Suarez, G. (1987). Survival of *Listeria monocytogenes* in raw milk treated in a pilot size pasteurizer. *Journal of Applied Bacteriology*, 63(1), 533-537.
- Figuera, B., Cabello, A. & Villalobos, L. (2005). Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en atún ahumado empacado al vacío. *Revista Zootecnia Tropical*, 23(2), 171-181.
- Flessa, S., Lusk, D. & Harris, L. (2004). Survival of *Listeria monocytogenes* on fresh and frozen strawberries. *International Journal of Food Microbiology*, 101(3), 255-262.
- Food and Agriculture Organization, FAO & Organización Mundial de la Salud, OMS. (2000). Consulta Mixta de expertos sobre la evaluación de riesgos asociados a los peligros microbiológicos en alimentos.
- Food and Drug Administration, FDA. & Bacteriological Analytical Manual, BAM. (2011). Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods.
- Frazier, W. & Westboff, D. *Microbiología de los alimentos*. 4ta Edición. Zaragoza - España: Editorial Acribia, S.A.
- Gandhi, M. & Chikindas, M. (2007). Listeria: a food borne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Microbiology*, 113(1), 1-15.
- García-Rodríguez, J. & Picazo, J. (2000). *Compendio de Microbiología Médica*. Madrid - España: Ediciones Harcourt Brace.
- Gill, A. & Holley, R. (2004). Mechanisms of Bacterial Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and Eugenol



- against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5750-5755.
- Graves, L., Helsel, L., Steigerwalt, A., Morey, R., Daneshvar, M., Roof, S., Orsi, R., Fortes, E., Milillo, S., Den Bakker, H., Wiedmann, M., Swaminathan, B. & Sauders, B. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1), 1280–1288.
- Guillet, C., Join, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer, M., Bielecka, M., Scotti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez, J., Lortholary, O. & Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerging Infectious Diseases*, 16(1), 136-138.
- Huertas, J., Guevara, L., Fernández, P. & Palop, A. (2008). Efecto de tratamientos isotérmicos sobre la supervivencia de *Listeria monocytogenes* evaluada in vitro. II Jornadas de Introducción a la Investigación de la Universidad Politécnica de Cartagena, Murcia-España.
- Instituto Nacional de Salud de Colombia. (2010). Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods, ICMSF. (1998). *Microbiología de los alimentos-Características de los patógenos microbianos*. Zaragoza - España: Editorial Acribia, S. A.
- Jawetz, E., Melnick, J. & Adelberg, E. (2005). *Microbiología Médica*. 18ª Edición. México D.F – México: Editorial El Manual Moderno.
- Jay, J., Loessner, M. & Golden, D. (2009). *Microbiología Moderna de los Alimentos*. 5ª Edición. España: Editorial Acribia S.A.
- Junttila, J., Niemelä, S. & Hirn, J. (1988). Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non haemolytic *Listeria*. *Journal of Applied Bacteriology*, 65(1), 321-327.
- Larson, A., Johnson, E. & Nelson, J. (1999). Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial cheese brines. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 1860-1868.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, P., Le Fleche, A., Roche, S., Buchrieser, C., Cadet, V., Le Monnier, A. & Lecuit, M. (2010). *Listeria rocourtiae* spp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(9).

- Lin, Y., Labbe, R. & Shetty, K. (2004). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Fish and Meat Systems by Use of Oregano and Cranberry Phytochemical Synergies. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5672-5678.
- López, V., Suárez, M. & Chico, I., Navas, J. & Martínez, J. (2006). *L. monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. *Revista Argentina de Microbiología*, 38(1), 224-234.
- Low, J., Wright, F., McLauchlin, J. & Donachie, W. (1993). Serotyping and Distribution of *Listeria* Isolates from Cases of Ovine Listeriosis. *Journal of the British Veterinary Association*, 133(1), 165-166.
- Lunden, J. (2004). Persistent *Listeria monocytogenes* Contamination in Food Processing Plants. Department of Food and Environmental Hygiene-Faculty of Veterinary Medicine-University of Helsinki, Finland.
- Madigan, M., Martinko, J. & Parker, J. (2004). *Biología de los Microorganismos*. 10ª Edición. Madrid - España: Editorial Pearson Prentice Hall.
- Miller, A. (1992). Combined water activity and solute effects on growth and survival of *Listeria monocytogenes* Scott A. *Journal of Food Protection*, 55(1), 414-418.
- Molina, S., Mercado, M. & Carrascal, A. (2009). Efecto de tiempo y temperatura de cocción en chorizo inoculados artificialmente con *Listeria monocytogenes*. *Revista Universitas Scientiarum*, 14(2-3), 198-205.
- Moscoso, J. (1993). Efecto de agregado de ácidos y temperatura sobre el desarrollo de *Listeria monocytogenes*. Recuperado de <http://ililacs.bvsalud.org/es/>
- Muñoz, A., Chaves, J., Rodríguez, E. & Realpe, M. (2013). *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. *Revista Biomédica*, 33(1), 283-291.
- Murray, P., Rosenthal, K., Kobayashi, G. & Pfaller, M. (2006). *Microbiología Médica*. 5ª Edición. Barcelona – España: Elsevier Science Editorial.
- Mytle, N., Anderson, G., Doyle, M. & Smith, M. (2006). Antimicrobial activity of clove (*Syzygium aromaticum*) oil in inhibiting *Listeria monocytogenes* on chicken frankfurters. *Food Control Journal*, 17(1), 102-107.

- Norrung, B. & Andersen, J. (2000). Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*, 30(3), 228-232.
- Organización Mundial de Salud Animal, OIE. (2004). Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres.
- Özdemir, H., Yildirim, Y., Kuplülü, Ö., Koluman, A., Göncüoglu, M. & Gökhan, I. (2006). Effects of lactic acid and hot water treatments on *Salmonella typhimurium* and *L. monocytogenes* on beef. *Food Control Journal*, 17(4), 299-303.
- Pao, S., Brown, E. & Schneider, K. (1998). Challenge studies with selected pathogenic bacteria on freshly peeled Hamlin orange. *Journal Food Science*, 63(1), 359-362.
- Pérez, 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"*, 8(22).
- Pérez, M. (2013). Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en salchichas tipo Huacho provenientes de los mercados de abastos del Cercado de Lima (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.
- Ramírez, L., Morón, A., Alfieri, A. & Gamboa, O. (2009). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de tomates (*Lycopersicum esculentum*) y cilantro (*Coriandrum sativum*) frescos en tres supermercados de Valencia. Venezuela. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 59(3), 318-324.
- Rodríguez, E., Cabrera, L. & Colina, G. (2009). *Listeria monocytogenes* en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad. *Revista NOVA- Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 7(11), 71-79.
- Rodríguez, M. & Manca de Nadra, M. (2009). Viabilidad de *Listeria monocytogenes* en un sistema de alimento acondicionado con combinaciones de compuestos fenólicos. Universidad Nacional de Tucumán, Buenos Aires- Argentina.
- Ruesca, N. (2012). *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos LPC- Resistencia a los antibióticos (Tesis de Maestría). Universidad de Zaragoza, Zaragoza- España.
- Schlech III, W., Schlech, W., Lavigne, P., Bortolussi, R., Allen, A., Haldane, E., Wort, A., Hightower, A., Johnson, S., King, S., Nicholls, E. &

- Broome, C. (1983). Epidemic Listeriosis-Evidence for transmission by food. *The New England Journal of Medicine*, 308(4), 203-206.
- Sergelidis, D. & Abraham, A. (2009). Adaptative response of *Listeria monocytogenes* to heat and its impact on food safety. *Food Control Journal*, 20(1), 1-10.
- Sharifi, A. & Moshtaghi, H. (2014). Heat Treatment of *Listeria monocytogenes* in Liquid Egg Products with Low Temperature. *American Journal of Food Technology*, 9(4), 217-222.
- Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Vera, H., Carrascal, A. & Mercado, M. (2004). Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. *Revista Actualidad & Divulgación Científica*, 7(1), 25-57.
- Vega, J. & Mercado, P. (2013). Sensibilidad antibacteriana de cultivos de *Listeria* sp. aislados de lugares de expendio de pollo y quesos en mercados de la ciudad de Trujillo (Perú). *Revista Científica de Estudiantes*, 1(2), 28-33.
- Villalobos, L. & Martínez, R. (2006). Susceptibilidad antimicrobiana de *Listeria* spp. aisladas de alimentos durante el período 2003-2004. Cumaná, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26(1), 31-34.
- Walker, S., Archer, P. & Banks, J. (1990). Growth of *L. monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*, 68(1), 157-162.

## **X. ANEXOS**

**Anexo 1. Características morfológicas y algunas propiedades de *L. monocytogenes* según el estudio**

CEPA	Características				
	Colonia	Tinción GRAM	β-hemólisis	Prueba de CAMP ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	Hidrólisis de esculina
<i>Listeria monocytogenes</i> (CÓDIGO)	1mm, brillantes con depresión central	G (+)	+	+	+

**Anexo 2. Factores que impactan en el crecimiento y la supervivencia de *L. monocytogenes* (En AESAN, 2011)**

FACTOR	Puede crecer			Sobrevive pero no crece
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura (°C)	-1.5 – 3.0	30.0 - 37.0	45.0	-18.0
pH	4.2 - 4.3	7.0	9.4 – 9.5	3.3 – 4.2
Actividad de agua (Aw)	0.90 - 0.93	0.99	> 0.99	< 0.90
Concentración de sal (%)	< 0.5	0.7	12 - 16	≥ 20

**Anexo 3. Concentraciones aproximadas de algunos componentes nutritivos de la leche (En Doyle, 2001)**

Componente	Cantidad
Agua	87,3g/100g
Lactosa	4,6g/100g
Grasa	3,9g/100g
Caseína	2,6g/100g
Proteínas del suero	0,6g/100g
Cationes de sales	
Sodio	58mg/100g
Potasio	140mg/100g
Calcio	118mg/100g
Magnesio	12mg/100g
Aniones de sales	
Citrato	176mg/100g
Cloruro	104mg/100g
Fósforo	74mg/100g
Nitrógeno no proteico	
Nitrógeno no proteico total	296mg/100g
Nitrógeno de la úrea	142mg/100g
Nitrógeno peptídico	32mg/100g
Nitrógeno aminoacídico	4mg/100g
Nitrógeno de la creatina	25mg/100g

#### **Anexo 4. Medio Base Oxford (En Difco, 2003)**

Digerido pancreático de caseína	8,9g
Peptona de proteosa N°3	4,4g
Extracto de levadura	4,4g
Corazón de res, infusión de 500g	2,7g
Almidón	0,9g
Cloruro sódico	4,4g
Esculina	1,0g
Citrato férrico de amonio	0,5g
Cloruro de litio	15,0g
Agar	15,3g

\*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios para uso en laboratorio

\*pH final =  $7,2 \pm 0,2$  a 25°C



**Anexo 5. Caldo de enriquecimiento selectivo para Listeria (base) según FRASER (En Merck, 2013)**

Peptona de proteosa	5,0
Peptona de caseína	5,0
Extracto de levadura	5,0
Extracto de carne	5,0
Cloruro sódico	20,0
Hidrogenofosfato disódico	9,6
Dihidrogenofosfato potásico	1,35
Esculina	1,0

\*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios para uso en laboratorio

\*pH final = 7,2 ± 0,2 a 25°C

**Anexo 6. Valores de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición**

Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
10°C	10 <sup>-1</sup>	>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-2</sup>	>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-3</sup>	33x10 <sup>3</sup>	>300	>300	>300
		61x10 <sup>3</sup>	>300	>300	>300
		85x10 <sup>3</sup>	>300	>300	>300
		64x10 <sup>3</sup>	>300	>300	>300
		84x10 <sup>3</sup>	>300	>300	>300
		101x10 <sup>3</sup>	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-4</sup>	8x10 <sup>4</sup>	>300	>300	>300
		9x10 <sup>4</sup>	>300	>300	>300
		10x10 <sup>4</sup>	>300	>300	>300
		2x10 <sup>4</sup>	>300	>300	>300
		10x10 <sup>4</sup>	>300	>300	>300
		8x10 <sup>4</sup>	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	>300	>300	>300
		3x10 <sup>5</sup>	>300	>300	>300
		1x10 <sup>5</sup>	>300	>300	>300
		2x10 <sup>5</sup>	>300	>300	>300
		4x10 <sup>5</sup>	>300	>300	>300
		0	>300	>300	>300
10°C	10 <sup>-6</sup>	0	>300	299x10 <sup>6</sup>	>300
		0	>300	154x10 <sup>6</sup>	>300
		0	>300	124x10 <sup>6</sup>	>300
		0	>300	150x10 <sup>6</sup>	>300
		0	224x10 <sup>6</sup>	198x10 <sup>6</sup>	>300
		0	289x10 <sup>6</sup>	210x10 <sup>6</sup>	>300

**Anexo 7. Valores de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 5°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición**

Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
5°C	10 <sup>-1</sup>	>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		172x10	>300	>300	>300
		156x10	>300	>300	>300
5°C	10 <sup>-2</sup>	192x10 <sup>2</sup>	>300	>300	>300
		203x10 <sup>2</sup>	>300	>300	>300
		199x10 <sup>2</sup>	>300	>300	>300
		180x10 <sup>2</sup>	>300	>300	>300
		82x10 <sup>2</sup>	>300	>300	>300
		76x10 <sup>2</sup>	>300	>300	>300
5°C	10 <sup>-3</sup>	61x10 <sup>3</sup>	100x10 <sup>3</sup>	178x10 <sup>3</sup>	>300
		50x10 <sup>3</sup>	105x10 <sup>3</sup>	201x10 <sup>3</sup>	>300
		45x10 <sup>3</sup>	93x10 <sup>3</sup>	190x10 <sup>3</sup>	>300
		40x10 <sup>3</sup>	85x10 <sup>3</sup>	213x10 <sup>3</sup>	>300
		23x10 <sup>3</sup>	195x10 <sup>3</sup>	256x10 <sup>3</sup>	284x10 <sup>3</sup>
		28x10 <sup>3</sup>	169x10 <sup>3</sup>	298x10 <sup>3</sup>	254x10 <sup>3</sup>
5°C	10 <sup>-4</sup>	30x10 <sup>4</sup>	75x10 <sup>4</sup>	132x10 <sup>4</sup>	>300
		34x10 <sup>4</sup>	70x10 <sup>4</sup>	140x10 <sup>4</sup>	226x10 <sup>4</sup>
		21x10 <sup>4</sup>	59x10 <sup>4</sup>	127x10 <sup>4</sup>	196x10 <sup>4</sup>
		26x10 <sup>4</sup>	62x10 <sup>4</sup>	135x10 <sup>4</sup>	205x10 <sup>4</sup>
		11x10 <sup>4</sup>	144x10 <sup>4</sup>	190x10 <sup>4</sup>	214x10 <sup>4</sup>
		8x10 <sup>4</sup>	136x10 <sup>4</sup>	156x10 <sup>4</sup>	287x10 <sup>4</sup>
5°C	10 <sup>-5</sup>	13x10 <sup>5</sup>	11x10 <sup>5</sup>	35x10 <sup>5</sup>	66x10 <sup>5</sup>
		18x10 <sup>5</sup>	13x10 <sup>5</sup>	41x10 <sup>5</sup>	100x10 <sup>5</sup>
		8x10 <sup>5</sup>	7x10 <sup>5</sup>	29x10 <sup>5</sup>	60x10 <sup>5</sup>
		10x10 <sup>5</sup>	9x10 <sup>5</sup>	25x10 <sup>5</sup>	78x10 <sup>5</sup>
		0	44x10 <sup>5</sup>	61x10 <sup>5</sup>	101x10 <sup>5</sup>
		0	40x10 <sup>5</sup>	52x10 <sup>5</sup>	129x10 <sup>5</sup>
5°C	10 <sup>-6</sup>	0	23x10 <sup>6</sup>	18x10 <sup>6</sup>	51x10 <sup>6</sup>
		0	19x10 <sup>6</sup>	24x10 <sup>6</sup>	66x10 <sup>6</sup>
		0	0	14x10 <sup>6</sup>	45x10 <sup>6</sup>
		0	0	13x10 <sup>6</sup>	52x10 <sup>6</sup>
		0	0	70x10 <sup>6</sup>	145x10 <sup>6</sup>
		0	0	65x10 <sup>6</sup>	168x10 <sup>6</sup>

**Anexo 8. Valores de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de 0°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición**

Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
0°C	10 <sup>-1</sup>	>300	>300	>300	>300
		>300	>300	>300	>300
		>300	>300	290x10	>300
		353x10	>300	281x10	>300
		400x10	>300	342x10	>300
		304x10	>300	389x10	>300
0°C	10 <sup>-2</sup>	66x10 <sup>2</sup>	103x10 <sup>2</sup>	68x10 <sup>2</sup>	80x10 <sup>2</sup>
		31x10 <sup>2</sup>	78x10 <sup>2</sup>	51x10 <sup>2</sup>	82x10 <sup>2</sup>
		20x10 <sup>2</sup>	112x10 <sup>2</sup>	67x10 <sup>2</sup>	77x10 <sup>2</sup>
		34x10 <sup>2</sup>	103x10 <sup>2</sup>	54x10 <sup>2</sup>	75x10 <sup>2</sup>
		70x10 <sup>2</sup>	119x10 <sup>2</sup>	52x10 <sup>2</sup>	66x10 <sup>2</sup>
		65x10 <sup>2</sup>	120x10 <sup>2</sup>	68x10 <sup>2</sup>	72x10 <sup>2</sup>
0°C	10 <sup>-3</sup>	8x10 <sup>3</sup>	16x10 <sup>3</sup>	9x10 <sup>3</sup>	14x10 <sup>3</sup>
		4x10 <sup>3</sup>	15x10 <sup>3</sup>	12x10 <sup>3</sup>	13x10 <sup>3</sup>
		11x10 <sup>3</sup>	13x10 <sup>3</sup>	10x10 <sup>3</sup>	17x10 <sup>3</sup>
		10x10 <sup>3</sup>	20x10 <sup>3</sup>	15x10 <sup>3</sup>	21x10 <sup>3</sup>
		6x10 <sup>3</sup>	12x10 <sup>3</sup>	9x10 <sup>3</sup>	11x10 <sup>3</sup>
		18x10 <sup>3</sup>	20x10 <sup>3</sup>	11x10 <sup>3</sup>	12x10 <sup>3</sup>
0°C	10 <sup>-4</sup>	1x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>4</sup>	9 x10 <sup>4</sup>
		3x10 <sup>4</sup>	8x10 <sup>4</sup>	8x10 <sup>4</sup>	7x10 <sup>4</sup>
		0	4x10 <sup>4</sup>	3x10 <sup>4</sup>	8x10 <sup>4</sup>
		0	4x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>4</sup>	6x10 <sup>4</sup>
		0	2x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>4</sup>
		0	4x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>4</sup>	8x10 <sup>4</sup>
0°C	10 <sup>-5</sup>	0	3x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>
		0	2x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	6x10 <sup>5</sup>
		0	1x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>5</sup>
		0	2x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>5</sup>	5x10 <sup>5</sup>
		0	1x10 <sup>5</sup>	0	3x10 <sup>5</sup>
		0	1x10 <sup>5</sup>	0	4x10 <sup>5</sup>
0°C	10 <sup>-6</sup>	0	0	1x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>6</sup>
		0	0	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>6</sup>
		0	0	0	1x10 <sup>6</sup>
		0	0	0	1x10 <sup>6</sup>
		0	0	0	1x10 <sup>6</sup>
		0	0	0	1x10 <sup>6</sup>

**Anexo 9. Valores de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -5°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición**

Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
-5°C	10 <sup>-1</sup>	126x10	54x10	92x10	12x10
		79x10	68x10	31x10	15x10
		97x10	78x10	37x10	14x10
		83x10	93x10	58x10	15x10
		167x10	119x10	146x10	75x10
		113x10	145x10	125x10	96x10
-5°C	10 <sup>-2</sup>	8x10 <sup>2</sup>	10x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>2</sup>	0
		7x10 <sup>2</sup>	7x10 <sup>2</sup>	0	0
		17x10 <sup>2</sup>	0	0	0
		11x10 <sup>2</sup>	0	0	0
		29x10 <sup>2</sup>	0	0	0
		24x10 <sup>2</sup>	0	0	0
-5°C	10 <sup>-3</sup>	3x10 <sup>3</sup>	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
-5°C	10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
-5°C	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
-5°C	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0

**Anexo 10. Valores de UFC/mL de *L. monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada a una temperatura de -10°C, teniendo en cuenta el tiempo de exposición**

Temperatura (°C)	Dilución	Unidades formadoras de colonias/mL (UFC/mL)			
		24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
-10°C	10 <sup>-1</sup>	24x10	18x10	14x10	8x10
		24x10	17x10	14x10	9x10
		14x10	18x10	16x10	10x10
		27x10	25x10	13x10	6x10
		27x10	20x10	26x10	22x10
		27x10	28x10	18x10	10x10
-10°C	10 <sup>-2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	0
		2x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	2x10 <sup>2</sup>	0
		2x10 <sup>2</sup>	3x10 <sup>2</sup>	3x10 <sup>2</sup>	0
		0	1x10 <sup>2</sup>	1x10 <sup>2</sup>	0
		0	0	2x10 <sup>2</sup>	0
		0	0	1x10 <sup>2</sup>	0
-10°C	10 <sup>-3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
-10°C	10 <sup>-4</sup>	0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
-10°C	10 <sup>-5</sup>	0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
-10°C	10 <sup>-6</sup>	0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0
		0	0	0	0

**Anexo 11. Análisis estadístico: Análisis de la Varianza (ANOVA)**

Linear Regression Comparison for:							
Descriptive Statistics							
Variable	Mean	Std Dev.	N				
A	48.774	30.030	31				
UFC/mL	6.606	1.867	31				
B	57.931	26.609	58				
UFC/mL	5.976	1.205	58				
C	65.425	26.309	73				
UFC/mL	4.373	0.679	73				
D	58.667	25.201	27				
UFC/mL	2.243	0.244	27				
E	51.429	26.387	14				
UFC/mL	2.760	0.380	14				
Individual Regression Details							
Summary	R <sup>2</sup>	R	Adj. R <sup>2</sup>	S.E. of Estimate	Count		
Reg 1	0.901	0.949	0.898	0.597	31		
Reg 2	0.506	0.711	0.497	0.855	58		
Reg 3	0.117	0.342	0.104	0.643	73		
Reg 4	0.247	0.497	0.217	0.216	27		
Reg 5	0.680	0.825	0.653	0.224	14		
Slope	Coefficient	Std Error	Std Beta	-95% C.I.	+95% C.I.	t	Prob.
Reg 1	0.059	0.004	0.949	0.052	0.066	16.251	0.000
Reg 2	0.032	0.004	0.711	0.024	0.041	7.567	0.000
Reg 3	0.009	0.003	0.342	0.003	0.015	3.063	0.003
Reg 4	-0.005	0.002	-0.497	-0.008	-0.001	-2.862	0.008
Reg 5	-0.012	0.002	-0.825	-0.017	-0.007	-5.048	0.000
Intercept	Coefficient	Std Error	-	-95% C.I.	+95% C.I.	t	Prob.
Reg 1	3.727	0.207	-	3.303	4.150	17.993	0.000
Reg 2	4.110	0.271	-	3.567	4.653	15.168	0.000
Reg 3	3.796	0.203	-	3.392	4.201	18.717	0.000
Reg 4	2.525	0.107	-	2.305	2.745	23.626	0.000
Reg 5	3.371	0.135	-	3.077	3.665	24.982	0.000
ANOVA	F	DF1	DF2	P			
Reg 1	264.099	1	29	0.000			
Reg 2	57.264	1	56	0.000			
Reg 3	9.383	1	71	0.003			

Reg 4	8.193	1	25	0.008	
Reg 5	25.479	1	12	0.000	
Slope Comparison: ANOVA					
Source	Sum Sq.	D.F.	Mean Sq.	F	Prob.
Regression	72.203	4	18.051	42.282	0.000
Residual	82.394	193	0.427		
Total	154.597	197			
Multiple Comparison tests for Slope°					
Group 1	Group 2	Mean Diff.	SE	q	Prob.
Reg 1	Reg 2	0.027	0.004	7.387	0.000
	Reg 3	0.050	0.003	14.390	0.000
	Reg 4	0.064	0.005	13.990	0.000
	Reg 5	0.071	0.006	12.638	0.000
Reg 2	Reg 3	0.023	0.003	7.560	0.000
	Reg 4	0.037	0.004	8.673	0.000
	Reg 5	0.044	0.005	8.204	0.000
Reg 3	Reg 4	0.014	0.004	3.284	0.138
	Reg 5	0.021	0.005	3.920	0.044
Reg 4	Reg 5	0.007	0.006	1.170	0.922
No Common Slope Exists					
No ANOVA for Intercept was performed as no Common Slope exists.					