



**UNIVERSIDAD NACIONAL
PEDRO RUÍZ GALLO**



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**

**FRECUENCIA DE *Listeria spp.* EN PALTA CONGELADA. PROVINCIA
DE VIRÚ – DEPARTAMENTO DE LA LIBERTAD – NOVIEMBRE 2015 –
MAYO 2016**

TESIS

Para optar el título profesional de:

**LICENCIADO EN
BIOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.**

Presentado por:

BR. MONTEZA ALARCON, ANA ROSA

LAMBAYEQUE – PERU

2018



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



TESIS

Frecuencia de *Listeria spp* en palta congelada. Provincia de Virú –
Departamento de La Libertad – Noviembre 2015 – Mayo 2016

PRESENTADA A LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS PARA OPTAR
EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

**LICENCIADO EN
BIOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA.**

PRESENTADO POR:

Br. Monteza Alarcón, Ana Rosa

APROBADO POR EL SIGUIENTE JURADO:

Msc. José T. Reupo Periche
Presidente

M. V. Zully Montenegro Esquivel
Secretario

Lic. Julio Silva Estrada
Vocal

Dra. Martha A. Vergara Espinoza
Patrocinadora

DEDICATORIA

Este trabajo dedico de manera muy especial a mis padres, pues ellos son los que me inculcaron el principal cimiento para la construcción de mi vida personal y profesional creando en mí las bases de responsabilidad, deseos de superación, optimismo y dedicación, siendo ellos los pilares de mi vida.

Agradecida con Jehová Dios por tener a mis tres hermanos Jorge, Marilú y Lucerito, a mi cuñada Jenny y a la luz de nuestra familia Ana Daniela, por lo que representan para mí y por ser parte importante de una familia unida.

Ana Rosa Monteza Alarcón.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento va dirigido a quien ha iluminado mí camino y me ha dirigido por el sendero correcto, a Dios, Él que en todo momento está conmigo apoyándome en aprender de mis errores y a tomarlo de la mejor manera, sin duda también a rodearme de gente buena y noble que suma a mi vida.

Agradecida con mis padres que día a día aportan lo mucho o poco que tienen para lograr nuestra meta: el tener una carrera profesional y desempeñarme en ella; por creer en mí y por apoyarme en mi toma de decisiones, de ellos me siento muy orgullosa y agradecida.

A mis hermanos por el apoyo moral en todos los cambios y caídas en mi vida, pues ellos me han demostrado que no se necesita de mucho para ser feliz.

A mi esposo que gracias a su comprensión, consejos y apoyo he logrado cumplir muchos de mis objetivos.

A mis dos grandes amigas Juanita Guzmán y Graciela Albino por el apoyo incondicional en esta tarea encomendada.

A mí querida asesora Dra. Martha Vergara Espinoza por la paciencia y conocimientos me ayudan a crecer profesionalmente.

Ana Rosa Monteza Alarcón

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia y ausencia de *Listeria sp.* en palta congelada.

Provincia de Virú – departamento de La Libertad.

Noviembre 2015 – Mayo 2016Pág. 23

Tabla 2. Frecuencia de especies de *Listeria spp.* en palta

Congelada. Provincia de Virú – departamento de La

Libertad - Noviembre 2015 – Mayo 2016..... Pág. 23

Tabla 3. Frecuencia de especies de *Listeria spp.* en palta congelada

Según la variedad. Provincia de Virú – departamento

De La Libertad- Noviembre 2015 - Mayo 2016..... Pág. 24

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Preparación de la muestra de palta para enriquecimiento en caldo <i>Listeria</i>	Pág. 17
Figura 2.	Preparación de la muestra - Procedimiento según la Norma.....	Pág. 17
Figura 3.	Detección Molecular <i>Listeria sp</i>	Pág. 18
Figura 4.	Fases para la detección molecular <i>Listeria sp</i>	Pág. 19
Figura 5.	Detección Molecular/ Método MDS.....	Pág. 20
Figura 6.	Presencia y ausencia de <i>Listeria sp</i> . en palta congelada.....	Pág. 22
Figura 7.	Presencia de <i>Listeria monocytogenes</i>	Pág. 22
Figura 8.	Pruebas bioquímicas para detección de especies de <i>Listeria spp</i>	Pág. 23
Figura 9.	<i>Listeria monocytogenes</i> . A: Colonias características en agar ALOA.....	Pág. 23
Figura 10.	Pruebas bioquímicas para detección de especies de <i>Listeria spp</i>	Pág. 24

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Preparación de medios de cultivo.....	Pág. 35
Anexo 2.	Control de calidad resultados para método cualitativo..	Pág. 35
Anexo 3.	Preparación de las muestras -Pre enriquecimiento....	Pág. 36
Anexo 4.	Detección molecular método MDS para <i>Listeria sp...</i>	Pág.36
Anexo 5.	Siembra en placas en Agar Aloa/Oxford.....	Pág.37
Anexo 6.	Pruebas bioquímicas para detección de especies de <i>Listeria spp</i>	Pág.37
Anexo 7.	Tablas de composición de los medios de cultivo de uso (Según Merck)	Pág.38
Anexo 8	Ingreso de datos al programa APPIWEB.....	Pág.40
Anexo 9.	Lectura de resultados de muestras analizadas en programa Molecular.....	Pág.41

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la frecuencia de *Listeria spp.* en palta congelada de la provincia de Virú – departamento de La Libertad entre noviembre de 2015 a mayo de 2016. Se procesaron 340 muestras de palta congelada de la provincia de Virú departamento de la Libertad siguiendo la metodología de UNE-EN ISO 11290-1, Microbiology of food for human and animal consumption. Horizontal method for the detection and counting of *Listeria monocytogenes*. Usando como medios de cultivo el Caldo fraser, agar Oxford y Agar Cromocult Ottaviani y Agosti. Se encontró que la frecuencia de *Listeria spp.* en palta congelada de la provincia de Virú – departamento de La Libertad - noviembre de 2015 - mayo de 2016 es de 15.90%; las especies de *Listeria* identificadas fueron *Listeria innocua* (42.59%), *Listeria monocytogenes* (29.63%), *Listeria ivanovii* (16.67%) y *Listeria seeligeri* (11.11%) y la variedad de palta con mayor índice de contaminación con *Listeria spp.* es la variedad Hass contaminada con *Listeria monocytogenes* (29.4%)

Palabras clave: *Listeria sp.*, Palta contaminada, *Listeria sp.* en palta.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the frequency of *Listeria* spp. in frozen avocado from the province of Virú - department of La Libertad from November 2015 to May 2016. 340 samples of frozen avocado from the province of Virú department of La Libertad were processed following the methodology of UNE-EN ISO 11290-1, Microbiology of food for human and animal. Horizontal method for the detection and counting of *Listeria monocytogenes*. Using the Fraser Broth, Oxford agar and Cromocult Ottaviani agar and Agosti as culture media. It was found that the frequency of *Listeria* spp. in frozen avocado from the province of Virú - department of La Libertad between November 2015 to May 2016 is 15.90%; The *Listeria* species identified were *Listeria innocua* (42.59%), *Listeria monocytogenes* (29.63%), *Listeria ivanovi* (16.67%) and *Listeria seeligeri* (11.11%) and the avocado variety with the highest rate of contamination with *Listeria* spp. is the Hass variety contaminated with *Listeria monocytogenes* (29.4%).

Key words: *Listeria* sp., Contaminated avocado, *Listeria* sp. in avocado.

I. INTRODUCCIÓN

La Palta es un fruto que se consume directamente como fruta fresca o como ensalada, también se usa en la elaboración de un producto procesado, aceite o producto congelado, es ampliamente cultivada y procesada en diversas regiones del país, sus productos deben cumplir con diferentes especificaciones contempladas en la Norma sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, en ella indica la cantidad de microorganismos que condiciona la peligrosidad para causar enfermedades alimentarias, sin embargo, en la elaboración del producto congelado se produce contaminación microbiana que depende de las condiciones de cultivo de la planta, el transporte inadecuado, la manipulación durante la transformación (Aguado *et al.*, 2006).

Un microorganismo que causa contaminación de producto congelado de Palta es *Listeria sp.* cuya especie *Listeria monocytogenes* resiste a diferentes condiciones ambientales, que en alimentos se ve favorecida por la humedad, temperatura, tolerancia al pH, agente conservantes como NaCl y nitritos, especialmente tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración (2-8°C) por la facultad de adherirse a superficies formando biopelículas para protegerse de la acción de tratamientos antimicrobianos, esto le permite alojarse en maquinarias, equipos, fajas, utensilios, cámaras de frío y túneles de congelación, sobreviviendo por periodos prolongados e inclusive hasta alcanzar la dosis infectiva la que se complica con la contaminación cruzada (Koneman *et al.*, 2008). Todas estas propiedades favorecen la contaminación de los alimentos desde su elaboración, distribución, almacenamiento, comercialización hasta su consumo (Norrung *et al.*, 2000).

Hoy en día se reconoce generalmente que la Listeriosis es en gran medida atribuible a la transmisión del microorganismo patógeno por los alimentos. La mayoría de los casos de listeriosis en personas son esporádicos o se enmarcan en brotes cuya delimitación geográfica, temporal, o ambas, es frecuentemente

difusa. Aunque la transmisión de *L. monocytogenes* puede ser vertical (de madre a hijo), zoonótica (de animal a persona) y nosocomial (contraída en un hospital), la importancia de los alimentos como vía primaria de transmisión de *Listeria monocytogenes* a las personas no se reconoció hasta la década de 1980, cuando se produjeron, en Norteamérica y Europa, varias grandes epidemias de listeriosis (Martino *et al.*, 2008 y Martin 2007). 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 (Madigan 2004).

El papel preponderante que ha tomado *Listeria monocytogenes* como microorganismo emergente productor de enfermedades transmitidas por alimentos ha conducido también a que se despierte un gran interés en plantas de alimentos, principalmente en aquellas en donde las condiciones de operación pueden ofrecer a la bacteria las condiciones adecuadas para que pueda instalarse, multiplicarse y contaminar al producto y de éste pasar directamente al consumo humano sin restricciones de edad, estado, enfermedad; de ahí que el objetivo de este trabajo se enfocó a determinar la frecuencia de *Listeria spp.* En palta congelada de la provincia de Viru – departamento de La Libertad entre noviembre 2015 a mayo de 2016.

Por todo lo afirmado anteriormente se formuló la siguiente interrogante ¿Cuál es la frecuencia de *Listeria spp.* en palta congelada provincia de Virú – departamento de La Libertad?, asumiendo que *Listeria spp* frecuentemente se encuentra en palta congelada, se ejecutó la presente investigación cuyo objetivo fue determinar la frecuencia de *Listeria spp.* en palta congelada provincia de Virú – departamento de La Libertad - noviembre 2015 - mayo 2016.

En el presente estudio se ha determinado la frecuencia de *Listeria spp.* en palta congelada y se ha identificado las principales especies de *Listeria* aisladas, con lo que se pretende que este conocimiento sea de utilidad en la toma de medidas correctivas para evitar la contaminación del producto, con lo

cual se reducirían las pérdidas económicas que se producen por dicha contaminación, además de ello, disminuir las posibilidades del riesgo de que se produzcan casos de listeriosis humana.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son un problema que debe ser considerado en un ámbito social, tecnológico, económico, cultural y político. Por ser un problema recurrente en los países en vías de desarrollo, las autoridades e instancias gubernamentales y otras instituciones afines, tanto del sector público como privado, deberían dirigir campañas de vigilancia y asistencia continua a fin de prevenir o corregir situaciones que pueden ser muy peligrosas y que pueden afectar adversamente la salud de la población (Ruesca N.,2012). 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: 4)

En Colombia existe un subregistro de la notificación de casos de enfermedades transmitidas por alimentos justamente en el año 2007 se reportaron al sistema nacional de vigilancia en salud pública 5.563 casos de enfermedades transmitidas por alimentos de los cuales se le hizo seguimiento a 5 brotes dando como resultados de contagio en 4 restaurantes y 1 en hogar , por lo mismo, la Organización Mundial de la Salud plantea que la mayoría de las contaminaciones que generan enfermedades, son transmitidas por

alimentos debido a una mala práctica de manipulación y almacenamiento, así mismo, en los países industrializados, como los Estados Unidos, se estima que cada año ocurren 76 millones de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, 325.000 hospitalizaciones y 5.000 muertes lo cual ha demostrado las grandes deficiencias sanitarias en algunos servicios de alimentación (Díaz *et al.*, 2007)

Listeria 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 y Koneman 2008), sobre todo en los rumiantes (Norrung *et al.*, 2004). Esta bacteria es contaminante frecuente de plantas procesadoras de alimentos, llegando a contaminar las superficies en contacto directo con los alimentos; incluido el producto mismo (Brock 2003, Aguado *et al.*, 2006 y Jay *et al.*, 2004).

Jay *et al.*, 2009, consideran a *Listeria monocytogenes* como un microorganismo que cuenta con una ecología microbiana muy diversa para asegurar su supervivencia, una de las características que destaca es su resistencia a un amplio rango de 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, *Listeria 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 *Listeria 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 incrementa el crecimiento y supervivencia en medios fríos.

Listeria 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 temperaturas 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 inmunodeprimidos (OMS 2004). La enfermedad causada por *Listeria spp.* es la Listeriosis, pero sólo a inicios de los años 80, fue reconocida como una enfermedad transmitida por alimentos, esto al ocurrir en Europa y Estados Unidos varios brotes de Listeriosis en que se demostró por estudios epidemiológicos que la cepa de *L. monocytogenes* aislada tanto del alimento como de los pacientes era la misma (Schlech *et al.*, 1983).

Flores, 2015, evaluó la supervivencia de *Listeria monocytogenes* en muestras inoculadas de leche pasteurizada en el departamento de Lambayeque, estableciendo como control diferentes temperaturas bajas como (-10,-5,0.5, 10) y tiempos de conservación (24, 48, 72, 96 horas). Utilizó una concentración de trabajo 10^6 UFC/ml del microorganismo de estudio, como medio de enriquecimiento y como diluyente al caldo Fraser y agar selectivo Oxford para la cuantificación de colonias. Los resultados indicaron que las bajas temperaturas y tiempo prolongado, como -10°C y 96 horas, tuvieron un impacto negativo sobre el ciclo de crecimiento de *Listeria monocytogenes* llegando a controlar su crecimiento logarítmico y a temperatura de -5° C hubo una mejor eliminación del microorganismo. Así mismo, que a temperaturas de refrigeración (5° C y 10° C) por periodos prolongados, el crecimiento microbiano es mucho más acelerado aún con mínimas cantidades de inóculo.

Pérez *et al.*, (2012) en Trujillo ejecutaron estudios en hortalizas tales como zanahoria, tomate, espinaca, lechuga y rabanito para determinar la frecuencia de *Listeria monocytogenes*; el muestreo se aplicó según la técnica peruana 2850-1:2009, durante los años 2010 y 2011, para ello se trabajó con 240 muestras obtenidas de diferentes mercados de abastos. El porcentaje de positividad total de aislamiento de *Listeria monocytogenes* fue del 25.42% y por el tipo de hortalizas fue: en tomate 10.42%, zanahoria 31.25%, espinaca 22.92%, lechugas 29.17% y en rabanito una positividad del 33.33%. Se concluyó que la fuente de contaminación es el agua servida proveniente del

alcantarillado de la ciudad que se utiliza para el cultivo de la mayoría de los alimentos, así mismo que la contaminación también es debida a la deficiencia higiénica sanitaria que presentan los centros de abastos.

Díaz *et al.*, (2012) realizaron una investigación en leche fresca y queso para detectar *Listeria monocytogenes*, se tomó de manera aséptica 60 muestras de leche fresca obtenida de establos y comedores de vaso de leche, además 60 muestras de queso fresco comercializado en la provincia de Trujillo; el muestreo se realizó según la norma técnica peruana NTP ISO 2859-1 :2009, además se aplicó encuestas a los comercializadores con la finalidad de evaluar los puntos críticos y los factores de contaminación. Como resultado se obtuvo que en leche fresca no se aisló *Listeria monocytogenes*, sin embargo para queso fresco se obtuvo 34% de positividad. Según la encuesta se detectó un sistema inadecuado de limpieza, desinfección y manipulación.

Moreno *et al.*, (2008) desarrollaron un estudio de sensibilidad a los antibióticos para *Listeria spp.* Microorganismo aislado de muestras de pescado de los mercados de la ciudad de Trujillo, se obtuvo como resultado 10 cepas de *Listeria monocytogenes* y 15 cepas de *Listeria sp.* El antibiograma mostró que el 90% de cepas de *Listeria monocytogenes* fueron sensibles a gentamicina, antibiótico aminoglucósido cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal; el 80% de cepas de *Listeria spp.* Fueron sensibles a vancomicina, ampicilina y gentamicina.

Segura y Castillo (2014) ejecutaron estudios en los años 2012 y 2013 y determinó la presencia de *Listeria monocytogenes* en 102 muestras de ensalada de frutas y 102 muestras de yogur natural colectadas en diferentes centros de expendio de la provincia de Trujillo. De las muestras de ensaladas de frutas se obtuvo un 7.84% de aislamiento de *Listeria monocytogenes* considerándose como factores de contaminación la manipulación y limpieza; en yogur se encontró un 4.90% de positividad, al respecto se afirmó que la leche, materia prima para la preparación de yogur natural, es inocua al momento de extraerla por no contener microorganismos patógenos, pero

después de 1 hora aproximadamente es un excelente caldo de cultivo para el crecimiento de este microorganismos.

Centurion *et al.*, (2014) hicieron un estudio para determinar la frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras *Listerias* en carne de pollo fresco y verduras frescas obtenidas en mercados y centros de abasto de Lima metropolitano. Se procesaron 50 muestras de cada una de las matrices, en verduras se trabajó con distintas matrices como espinacas, espárragos, lechuga, col y apio; se empleó el método ISO 11290. Se obtuvo 22% de positividad en carne de pollo del cual 2% correspondió a *Listeria monocytogenes* y 20% para *Listeria innocua*, además se obtuvo 7.7% de *Listeria monocytogenes* en verduras específicamente espárragos.

Herrera *et al.*, (2012) realizaron trabajos de aislamiento e identificación de *Listeria spp* a partir de muestras de pescado fresco de la ciudad de Pamplona, empleando el método de inmunocromatografía, además se aplicaron encuestas considerando un muestreo por proporciones. En 51 muestras de pescado se obtuvo una prevalencia de 3.95% del cual se logró identificar en el 17.6% *Listeria innocua*, en el 13.7 % *Listeria grayi* y en el 35,3% *Listeria monocytogenes*. Se concluyó que la prevalencia de *Listeria sp* en muestras es muy alta, debido a que existe una contaminación de las aguas servidas, residuales, domesticas, industriales y de diferente índole, considerando además que durante el transporte y distribución del pescado existe contaminación adicional como la cadena de frio.

Betancourt *et al.*, (2010) con la finalidad de determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en matrices de longanizas, hortalizas y leche que contaban con resolución sanitaria y usando la metodología de Food and Drug Administration (FDA), analizaron 72 muestras de longanizas y 48 muestras de hortalizas. Obtuvieron 61% y 16,6% de positividad a *Listeria monocytogenes* para las muestras de longanizas y hortalizas respectivamente. En la leche no se reportó aislamientos de la bacteria investigada. Se determinó la importancia de prácticas higiénicas estrictas durante la manipulación de los alimentos en las empresas agro alimentarias donde existe dificultad para el control de la desinfección y la higiene.

Ruesca, N. (2012), realizó el recuento y 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°C y 10°C, siendo mayor el número de UFC/g a 10°C, oscilando los recuentos entre 1×10 a $5,9 \times 10^2$ UFC/g. En un 19,6 % de las muestras se detectó *Listeria 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 *Listeria monocytogenes* hasta el final.

ILNAS- ISO 11290-1:2017 desarrollo en Francia en el año 2013 un estudio en el participaron 17 laboratorios internacionales para comprobar la sensibilidad de su método detección para *Listeria sp.* Para ello utilizaron diferentes matrices como Salmon ahumado en frio, muestras ambientales, ensaladas listas para el consumo humano, formulas alimenticias para bebes y queso para ello se contaminó artificialmente las muestras ambientales y queso con *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*, para salmón ahumado en frio con *Listeria monocytogenes* y *Listeria welshimeri*, en muestras ambientales también se les inoculo cepas de *Staphylococcus epidermides*, *Pseudomonas fragilis*, *Bacillus cereus* y para ensaladas y formula para bebe fueron contaminados con *Listeria monocytogenes*, se utilizó el método de 11290-2017 Método de enumeración e identificación de *Listeria monocytogenes*.

Como conclusión, todos los laboratorios obtuvieron una sensibilidad de 100% positivos para *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado en frio, para muestras ambientales solo se obtuvo una sensibilidad de 99.1% puesto que un laboratorio quedo fuera por recibir muestras abiertas, en muestras de ensaladas se obtuvo en 97% sensibilidad puesto que en tres laboratorios se obtuvo falsos positivos posible contaminación del manipulador, en fórmula para bebes se obtuvo una sensibilidad de 99.2% un laboratorio quedo fuera del

concurso por recibir muestras abiertas y en queso se obtuvo 91% debido que un laboratorio recibió muestras demasiado tarde, solo 3 laboratorios detectaron *Listeria monocytogenes* de 8 muestras.

Martino *et al.*, 2008, realizaron estudios en Cuba en los meses de enero y abril del 2006 en puntos de venta de la Habana, se tomó 86 muestras de vegetales como lechuga, col, zanahorias, frijolitos chinos en condición de frescos para su análisis se trabajó con el método de detección ISO 11290-1 para la confirmación y con un método rápido (OXOID test de listeria rápido) como experimento, para algunas muestras se empleó hasta una semana de incubación con caldo selectivo Fraser para obtener cultivos puros. De 86 muestras en el 94.2% no se logró detectar *Listeria sp.* Se detectó 2.3% de *Listeria spp* de la misma manera se reportó 3.5% de *Listeria innocua*, única especie hallada.

En el año 2011, la Listeriosis se consideró como enfermedad reto para la salud, debido a un brote de dicha enfermedad en 19 ciudades de Estados Unidos por consumo de melones contaminados con *L. monocytogenes* que dejó 13 muertos y 74 enfermos; se pidió el retiro de todo el melón de producción de Jensen Farms que solo se repartió por todo el estado y no se realizó la exportación de este fruto. Los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) advirtieron de un probable aumento de víctimas debido al largo período de incubación de la bacteria que varía de 3 a 70 días, situación que hace muy difícil realizar la encuesta epidemiológica y la toma de muestras de alimentos ya que una persona puede llegar a enfermar después de dos meses de haber contraído la bacteria. Es importante saber que el melón no es un sustrato idóneo para el crecimiento de *Listeria* pero por la característica ubicua que tiene se le puede encontrar en pocas cantidades y bajo condiciones adecuadas puede causar una intoxicación alimentaria (Ibáñez 2011).

Según Ibáñez (2011), en el año 2008 se detectó un brote de intoxicación por *Listeria monocytogenes* en alimentos como el consumo de producto cárnico producido por Maple Leaf Foods, en Canadá. Se confirmó la existencia de 29

casos con esta intoxicación de los cuales 12 personas habrían muerto, considera el autor que *L. monocytogenes* crece lentamente en carnes refrigeradas que al ser consumidas pueden causar enfermedad grave en mujeres embarazadas, personas mayores, y otras personas con sistemas inmunológicos débiles. Los síntomas son fiebre, dolores musculares, y a veces, síntomas gastrointestinales como náuseas o diarrea. Si la infección se propaga al sistema nervioso, aparecen síntomas como dolor de cabeza, rigidez en el cuello, confusión, pérdida de equilibrio o convulsiones. Se determinó como causa de la intoxicación el ingreso de carne contaminada con *Listeria spp.* No habiéndose tomaron las medidas necesarias por la autoridad sanitaria.

III. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Material Biológico: Palta congelada

Cepas de referencia: *Listeria monocytogenes*: Culti-loops ATCC7644

Listeria innocua: Culti-loops ATCC33090

3.1.2. Población y muestra de estudio

La población estuvo representada por todas las paltas congeladas producidas en la provincia de Virú. Se estimó el tamaño muestras utilizando como prevalencia teórica la indicada en un trabajo realizado en Perú en el cual el porcentaje de positividad es 0.18% prevalencia (Pérez *et al.*, 2012)

Se aplicó la fórmula y se determinó el número necesario de muestras, que fue de 227; sin embargo, se aplicó las proporcionalidades, y se trabajó con el total de muestras analizadas en los meses noviembre del 2015 hasta mayo del 2016.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1 Tipo de estudio y Diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación es de tipo descriptivo y correspondió a una investigación con Diseño no experimental de una sola casilla.

3.2.2 Obtención de la muestra:

Estas fueron proporcionadas por las agroexportadoras de alimentos congelados. La toma de muestra de cada lote de palta se realizó al azar, de forma manual en bolsas estériles debidamente codificadas, a una temperatura de -10°C los mismos que fueron transportados al laboratorio de

análisis de alimentos a una temperatura de conservación de -14°C, donde se le realizó el análisis para detección de *Listeria sp.*

3.2.3 Preparación de la muestra:

Se siguió el procedimiento descrito en la NTP ISO 11133-1:2009 Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media.

Se desinfectó el área de trabajo y la superficie del empaque de la muestra con alcohol. La muestra se sometió a un enriquecimiento en Caldo Listeria. La muestra de palta se homogenizó con una cuchara estéril y se pesó 25 gramos de diferentes puntos en una bolsa esterilizada, se agregó Caldo Listeria hasta completar 250ml, se dejó en reposo 15 minutos y luego se llevó la muestra preparada al Stomacher por 2 minutos. Se incubaron a 30°C por un periodo de 24 a 26 horas aproximadamente, se retiró de la incubadora y se homogenizó con pequeños movimientos. Para asegurar la calidad del análisis se utilizó cepas control, siguiendo el mismo procedimiento realizado para las muestras (Fig. 1 y Fig. 2)

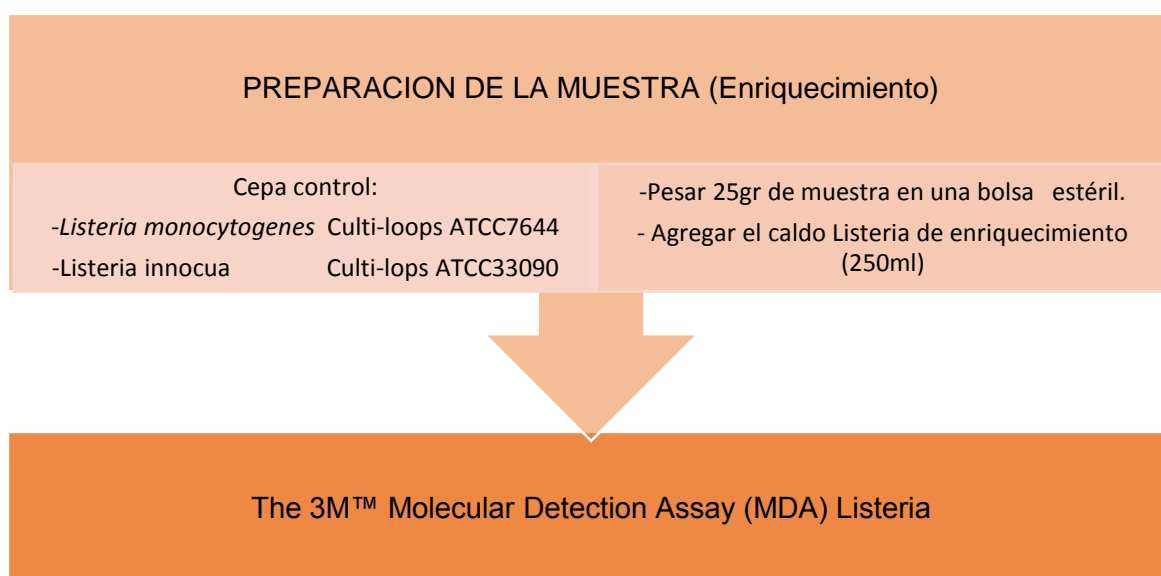


Fig. 1 Preparación de la muestra de palta para enriquecimiento en caldo Listeria



Fig. 2 Preparación de la muestra: A) Recepción de la muestra. B) Homogenización C) Pesado D) Incubación

3.2.4 Detección de *Listeria sp.*

Se siguió el método descrito en The 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Listeria sp.* Para la detección de especies de *Listeria* en alimentos.

El ensayo utiliza la amplificación isotérmica mediada por un bucle para amplificar rápidamente el ADN de *Listeria* con alta especificidad y sensibilidad, en combinación con la bioluminiscencia para detectar la amplificación. Sus fases son:

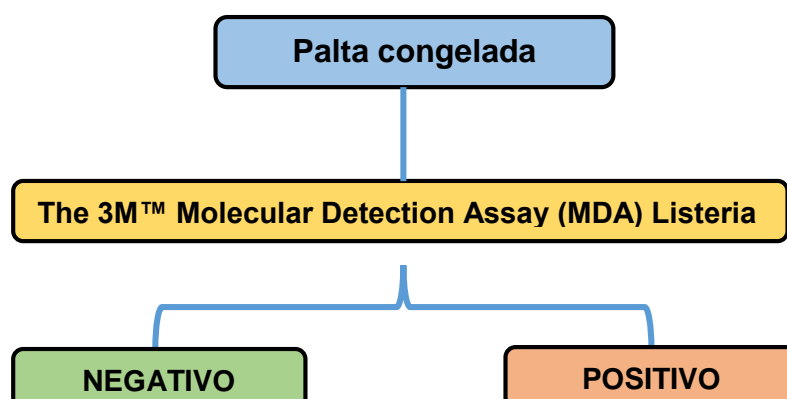


Fig. 3. The 3M™ Molecular Detection Assay (MDA) *Listeria sp.*

A. Fase de Acondicionamiento

Se retiró el Kit MDS y se dejó en reposo por 2 horas a temperatura ambiente; se codificó los pocillos de lisis del kit, utilizando un pocillo por muestra y se adiciono uno pocillo como control negativo. Con ayuda del auxiliar (accesorio del kit) las tapas de los pocillos fueron abiertas y se agregó 20 ul de la muestra enriquecida en cada pocillo; para el pocillo de control negativo se agregó reactivo del mismo kit, se cubrió con las tapas los pocillos, se homogenizo con movimientos de arriba hacia abajo por 3 a 5 veces.

B. Fase de lisis

Se enciendo el calentador, colocando un termómetro como control de temperatura entre 99 -101⁰C; previamente dos horas antes se colocó el bloque de enfriamiento al congelador por 2 horas aproximadamente, hasta que alcanzo una temperatura de -20⁰C. se colocó el kit de muestras al calentador este estaba en temperatura requerida, por 15 minutos, cumplido el tiempo se retiró del calentador y se colocó al bloque de enfriamiento por 10 minutos; finalmente se homogenizo invirtiendo los pocillos de 3 a 5 veces dejando en reposo por 5 minutos.

C. Fase de amplificación

Se agregó 20 ul de muestra de los pocillos de lisis a los pocillos reactivos, mezclando suavemente pipeteando de 3 a 5 veces de abajo hacia arriba. Se agregó 20ul de muestra del pocillo de lisis de control negativo al pocillo reactivo del control positivo.

Se encendió el equipo MDS e ingresó los códigos de las muestras al Software del equipo, donde después de haber alcanzado la temperatura de 60° C. se evidencio una luz verde indicadora, se tocó clip en botón de inicio y este automáticamente se abrió, donde se cargó la bandeja con los pocillos. Empezando la lectura. Durante el proceso de lectura se observó el grafico

con los resultados Positivo (+) y después de terminado la lectura se observó los resultados Negativo (-)

Se representó en un gráfico todas las muestras junto con los controles positivo y negativo, las líneas expresadas siguieron al control según su resultado.

Las muestras negativas siguieron al control negativo que gráficamente fue una línea horizontal.

Las muestras presuntivas para *Listeria sp.* Siguieron la representación del control positivo que gráficamente es una curva. (Fig. 4)

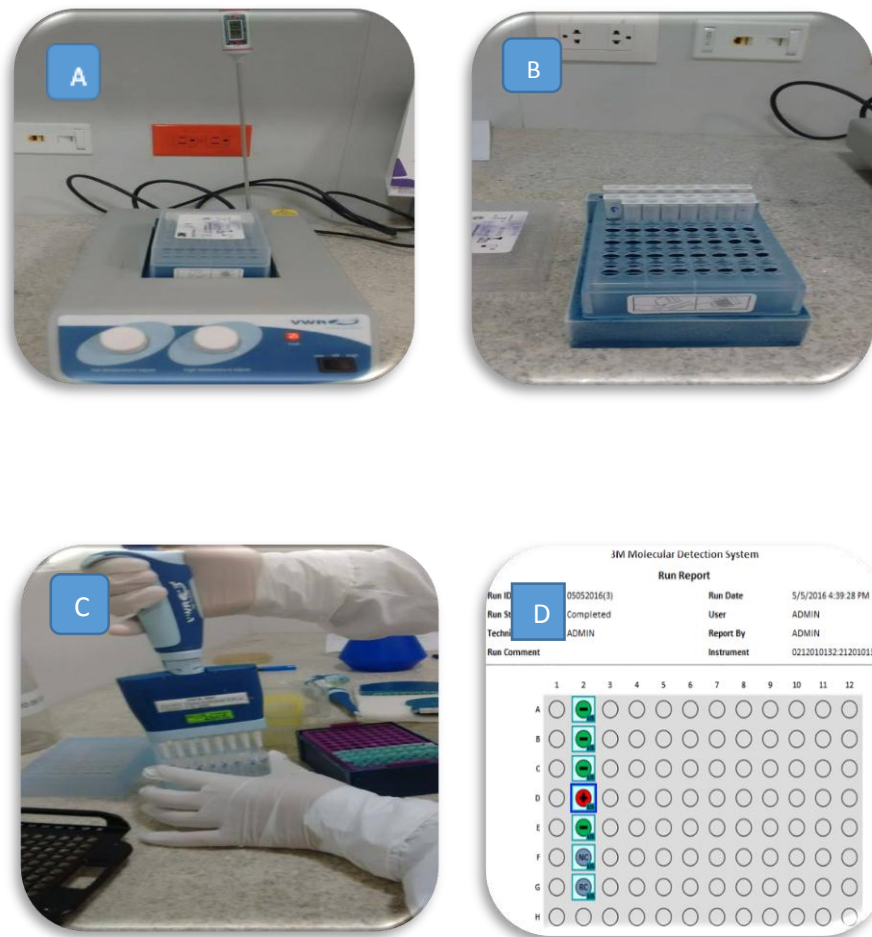


Fig. 4 Detección molecular: A) Fase de lisis. B) Fase de enfriamiento C) Fase de amplificación D) Grafico de pocillos positivos y negativos

3.2.5 Confirmación de *Listeria spp.*

Se siguió con la norma UNE-EN ISO11290-1, Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*.

Para la confirmación se utilizó placas con agar ALOA y Agar OXFORD y la siembra se realizó empleando el método de siembra en superficie. Las placas se colocaron en incubadora a 37°C por un tiempo máximo de 24 horas; paralelamente se agregó 0.1ml de la muestra a tubos con 10 ml caldo Fraser donde se incubó a 37°C por 48 hrs.

El crecimiento característico de *Listeria spp.* En agar ALOA se evidencio colonias color verdosas debido al sustrato cromogénico que detecto la enzima B glucosidasa que presentan todas las especies. Del mismo modo en Agar OXFORD formaron colonias blancas rodeadas de un halo negro debido a la hidrólisis de la esculina.

Se seleccionó 5 colonias distintas de las placas con Agar ALOA y OXFORD, se tomaron en cuenta parámetros de color, forma, borde, brillo, elevación y consistencia; la caracterización morfológica celular se llevó a cabo realizando una tinción de GRAM a cada colonia diferente, describiendo su forma, disposición y reacción al GRAM. También se realizó el método de gota pendiente donde se observó la movilidad de las bacterias, prueba de catalasa y prueba de APPI (pruebas bioquímicas). Las colonias seleccionadas fueron codificadas y conservadas en Agar TSAYE e incubaron por 18 a 24 horas para obtener un cultivo joven y puro (Fig. 5).



Fig. 5 Confirmación de las características morfológicas y culturales de *Listeria sp.*

3.3.ANÁLISIS Y PROCESAMIENTO DE DATOS:

Los datos obtenidos fueron ordenados y presentados en tablas y gráficos usando el programa Microsoft Excel 2010 para el ordenamiento de los datos, además se utilizó estadística descriptiva usando el procesador SPSS, versión 13 para Windows, presentándose los resultados en tablas y figuras de distribución de frecuencias para determinar si la frecuencia de contaminación del producto con *Listeria spp.* Es dependiente o no del tiempo de preparación y de la cantidad de producto procesado.

IV. RESULTADOS

En el periodo de estudio, de Noviembre del 2015 - mayo del 2016, se obtuvo el 15.9% de positividad de aislamiento de *Listeria sp* en palta congelada procedente de la provincia de Virú, departamento de La Libertad.

Fig. 6 Tabla 1 Presencia y ausencia de *Listeria sp.* en palta congelada. Provincia de Virú – departamento de La Libertad-Noviembre 2015 - Mayo 2016.

Nº de muestras	Resultados	Porcentaje
286	Ausencia en 25g	84,10%
54	Presencia en 25g	15,90%
340	Total de muestras	100%

En la tabla 2 y Fig.7 Se observa la distribución de las principales especies de *Listeria spp.* aisladas de palta congelada de la provincia de Virú – departamento de La Libertad, la especie aislada con mayor frecuencia fue *Listeria innocua*, 23 muestras que representan el 42.50%, en segundo lugar se ubica *Listeria monocytogenes* en 16 muestras (29.63%); otras especies identificadas fueron *Listeria ivanovii* y *Listeria seeligeri*

Fig. 7 Tabla 2. Frecuencia de especies de *Listeria spp.* en palta congelada. Provincia de Virú – departamento de La Libertad-Noviembre 2015 - Mayo 2016.

Especie	Frecuencia	Porcentaje
<i>Listeria innocua</i>	23	42.59%
<i>Listeria monocytogenes</i>	16	29.63%
<i>Listeria ivanovii</i>	9	16.67%
<i>Listeria seeligeri</i>	6	11.11%
Total	54	100%

En relación a la identificación de *Listeria* según variedad de palta, en la tabla 3 y Fig.8 se aprecia que la palta variedad Hass fue la más susceptible de contaminarse y la variedad Ettinger fue la menos susceptible; las especies.

Fig. 8 Tabla 3. Frecuencia de especies de *Listeria spp.* en palta congelada según la variedad. Provincia de Virú – departamento de La Libertad. Noviembre 2015 - Mayo 2016

Determinación de especie	Variedad							
	Palta Convencional		Palta Ettinger		Palta Hass		Total	
	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%	Frec.	%
<i>Listeria ivanovii</i>	0	0,0%	1	50.0%	8	15.7%	9	16,6%
<i>Listeria innocua</i>	0	0,0%	1	50.0%	22	43.2%	23	42,7%
<i>Listeria monocytogenes</i>	1	100,0%	0	0	15	29.4%	16	29,6%
<i>Listeria seeligeri</i>	0	0,0%	0	0	6	11.7%	6	11,1%
Total	1	100,0%	2	100,0%	51	100,0%	54	100,0%

Fig. 9 *Listeria monocytogenes*. A: Colonias características en agar ALOA B: Colonias características en agar OXFROD

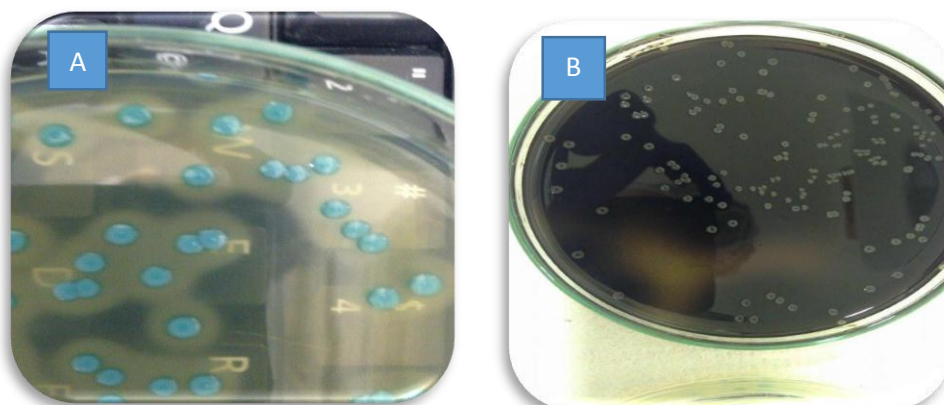
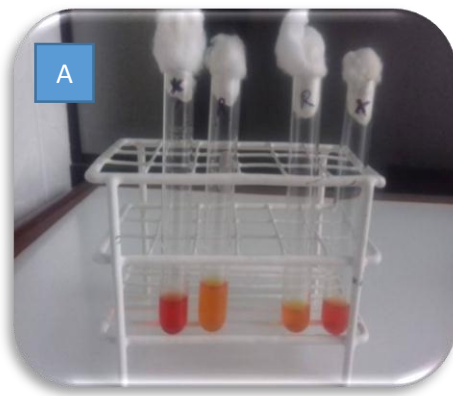


Fig. 10 Pruebas bioquímicas para detección de especies de *Listeria* spp,

A: Ramnosa (+) y Xilosa (-) B: Pruebas rápidas APPI para detección de especies



V. DISCUSIÓN

Listeria sp. Es una especie bacteriana resistente a amplios márgenes de temperatura, pH, disponibilidad de agua y salinidad, de lo cual depende que su crecimiento sea rápido o lento, así mismo, dichas condiciones influyen en su conservación y posibilidades de contaminar diversos alimentos o productos alimenticios como por ejemplo las paltas congeladas.

En esta investigación se obtuvo una frecuencia de aislamientos de *Listeria sp.* del 15.9%, porcentaje menor al obtenido por Centurión *et al.*, (2014) a partir de carne de pollo (22%) al reportado por Díaz *et al.*; 2012 en queso (34%); esta diferencia se puede explicar básicamente teniendo en cuenta el sustrato del cual se ha aislado el microorganismo y de las condiciones de manipulación y conservación, así en este estudio el producto fue palta congelada, por tanto con posibilidades de contaminarse desde la recolección del fruto hasta su procesamiento y conservación, e incluso con la multiplicación de *Listeria spp.* bajo condiciones de congelación, tal y como lo demostró Flores (2015), sin embargo, al ser un producto procesado también es sometido a condiciones de control de calidad e inocuidad que conlleva a una disminución de la contaminación, en cambio la carne de pollo y queso que son productos frescos, no congelados, generalmente manipulado y expendido bajo condiciones no asépticas en mercados por tanto con mayores posibilidades de contaminación.

Así mismo, la cifra encontrada es mayor a la obtenida por Herrera *et al.*, (2012) en pescado fresco (3.95%), en este caso, a lo ya explicado de la palta congelada, es posible una influencia de los métodos de laboratorio desarrollados para el enriquecimiento, aislamiento e identificación del microorganismo de interés, así en este estudio se aplicó Normas Técnicas Peruanas ISO, utilizando medios de cultivo de enriquecimiento como Caldo Listeria y medios especiales para la identificación, como agar ALOA y Agar , esto complementado con técnicas moleculares de gran sensibilidad, es decir con capacidad para detectar los casos positivos, a diferencia del método aplicado por el autor mencionado, la

inmunocromatografía, que probablemente tiene una menor sensibilidad que las ya mencionadas.

También el porcentaje de positividad de *Listeria sp* hallado en esta investigación (15.9%) es mayor al 2.3% encontrado por Martino *et al.*, 2008 en vegetales como lechuga, col, zanahorias y frijolitos chinos en condición de frescos, tomados de puestos de expendio en mercados; probablemente la diferencia se deba a la limpieza externa a la que son sometidos dichos productos agrícolas antes y durante el expendio para hacerlos más presentables al comprador lo que disminuye la concentración de microorganismos en la superficie, no sucediendo así en las paltas cuya contaminación se produce en la pulpa por medio del pedúnculo. A ello debe adicionársele que *Listeria* crece más rápido a temperaturas de 5° C y 10° C (refrigeración) por periodos prolongados, tal y como lo han demostrado experimentalmente Flores (2015), Ruesca, N. (2012) y NTP ISO11290-1:2017.

En relación a las especies de *Listeria spp.* identificadas, en esta investigación la especie que tuvo un mayor porcentaje de aislamiento fue *Listeria innocua* (42.59%) seguida de *Listeria monocytogenes* (29.63%), en ésta última especie, porcentaje mayor a lo obtenido por Martino *et al.*, 2008, Pérez *et al.*, (2012), por Centurión *et al.*, (2014) y por Betancourt *et al.*, (2010), para el caso de verduras y hortalizas frescas; la justificación es similar a lo ya explicadas en el párrafo anterior y que guardan relación con el porcentaje global reportado por los autores mencionados. De la misma manera, el porcentaje de *Listeria monocytogenes* (29.63%) es mayor al reportado por Segura *et al.*, (2014) en ensalada de fruta (7.8%) y yogur (4.9%) lo que se explica en la materia prima utilizada, es decir, en palta existe mayor posibilidades de encontrar la especie mencionada que en productos que destinados al consumo directo cuyos insumos deben ser de buena calidad y manipulados adecuadamente.

El porcentaje de aislamiento de *Listeria monocytogenes* en la presente investigación es menor al obtenido por Betancourt *et al.*, 2010 en muestras de longanizas (61%), al respecto, como ya se ha manifestado, en éste trabajo las paltas congeladas son procesadas y conservadas, aun así, con riesgo de

contaminarse con *Listeria monocytogenes*, sin embargo los autores referidos realizaron su trabajo con matrices procedentes de empresas agro alimentarias que presentaban dificultades para el control de desinfección y la higiene de sus productos.

En relación al tipo de palta contaminada, en este estudio, la variedad del fruto Hass presenta *Listeria monocytogenes*, en una frecuencia de 29.6 % teniendo como un factor a favor la estructura externa que presenta, un epicardio rugoso que permite el alojamiento de polvo y la consistencia pastosa y húmeda, entre otros factores que favorece el desarrollo, multiplicación y contaminación del fruto que durante su elaboración como producto congelado se aloja en plantas procesadoras de alimentos tal como lo menciona (Torres *et al.*, 2004 y Koneman 2008), que por falta de buenas prácticas de higiene y por una defectuosa sanitización. Este microorganismo causa daños irreversibles en la salud pública y pérdidas económicas grandes al sector agroindustrial.

Es importante tener en cuenta que la palta es un producto alimenticio sin restricción para su consumo, de ahí la importancia de determinar la presencia en dichos productos de *Listeria monocytogenes*, bacteria causante de Listeriosis que afecta por igual a afecta a niños, ancianos, mujeres gestantes y personas inmunocomprometidas. Complementariamente se fundamentan los resultados del presente estudio, en el hecho que la palta, es congelada, condición que, a diferencia de otros microorganismos, es un factor que permite la multiplicación de *Listeria*.

VI. CONCLUSIONES

De los resultados de la presente investigación se concluye lo siguiente:

- La frecuencia de *Listeria spp.* en palta congelada de la provincia de Virú – departamento de La Libertad entre noviembre de 2015 a mayo de 2016 es de 15.90%
- Las especies de *Listeria* identificadas en en palta congelada de la provincia de Virú – departamento de La Libertad fueron *Listeria innocua* (42.59%), *Listeria monocytogenes* (29.63%), *Listeria ivanovi* (16.67%) y *Listeria seeligeri* (11.11%)
- La variedad de palta con mayor índice de contaminación con *Listeria spp.* Fue la palta Hass con un total de 51 muestras contaminadas.

VII. RECOMENDACIONES

De la investigación realizada se recomienda lo siguiente:

- Aplicar las buenas prácticas en nuestra vida diaria como lavarse las manos después de cada comida, después de ir a los servicios higiénicos y cuando sea necesario, mantener nuestros alimentos en refrigeración en empaque cerrado para evitar contaminaciones cruzadas.
- Desarrollar un plan maestro la cual ayude a programar limpieza y mantenimiento a los equipos, para poder restaurar equipos dañados, evitar acumulación de materia orgánica y el saneamiento en planta.
- Establecer un programa de monitoreo de patógenos tanto zoonóticos como no zoonóticos a fin de reducir los riesgos de enfermedad en personas consumidoras de palta.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguado, G., Faggian, F. y Jiménez, M. (2006). Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid - España: Editorial Médica Panamericana.
2. Allen, S. y Koneman, E. (2008). Bacilos grampositivos aerobios facultativos. Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas. 6ª Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. España
3. Betancourt, O., Villagrán, K. y Muñoz, F. (2010). Serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados de alimentos producidos en la provincia de Cautín (Tesis de Licenciatura) Universidad Católica de Temuco. Chile.
4. Bille, J. (1990). Epidemiology of listeriosis in Europe, with special reference to the Swiss outbreak. Págs. 71-74, Europe.
5. Brock, T., Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2003). Biología de los microorganismos. 10ª Edición. Madrid - España: Editorial Pearson Prentice Hall.
6. Centurión, P., Takajara, M., Benedicto S. y López. F. (2006) Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras Listerias en carne de pollo fresco y verduras frescas obtenidas en mercados y centros de abasto de Lima metropolitano. Ciencia e investigación UNMSM. 85 pp
7. De Curtis, M., Franceschi, O. y De Castro, N. (2002). *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. Archivos Latinoamericanos de Nutrición – Universidad Central de Venezuela., Vol. 52 (3): 282-288.

8. Díaz, M., Chávez, M. y Saucedo, E., (2012). Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en leche fresca y queso fresco como vehículo transmisor de Listeriosis humana en la provincia de Trujillo-Perú. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en la Universidad Nacional de Trujillo. 40pp
9. Díaz, T., Caballero, A., Díaz, J., Cardona, M., Morejón, P. y Sánchez, Y., (2007) Estudio, control y prevención de las ETA: infección e intoxicación por alimentos. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos, Colombia
10. 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. 55pp
11. Flores, A. (2015) Efecto de bajas temperaturas y tiempo en el control de *Listeria monocytogenes* inoculada en leche pasteurizada. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.
12. Herrera, F. y Suarez, W. (2012). Aislamiento e identificación de *Listeria spp.* a partir de muestras de pescado fresco expandido en Pamplona. Vol.15 nº 2 Bogotá.
13. Ibáñez C. y Martí, E., (2011) Salud y algo mas/ fundación para el conocimiento. http://www.madrimasd.org/blogs/salud_pública/2008/08/28/99634/
14. Ibáñez C. y Martí, E., (2011) Salud y algo mas/ fundación para el conocimiento. http://www.madrimasd.org/blogs/salud_pública/2008/08/28/99634/
15. ISO 11133-1:2009 (2014) Microbiology of food and animal feeding stuffs. Guidelines on preparation and production of culture media. First edition 2000-06-01

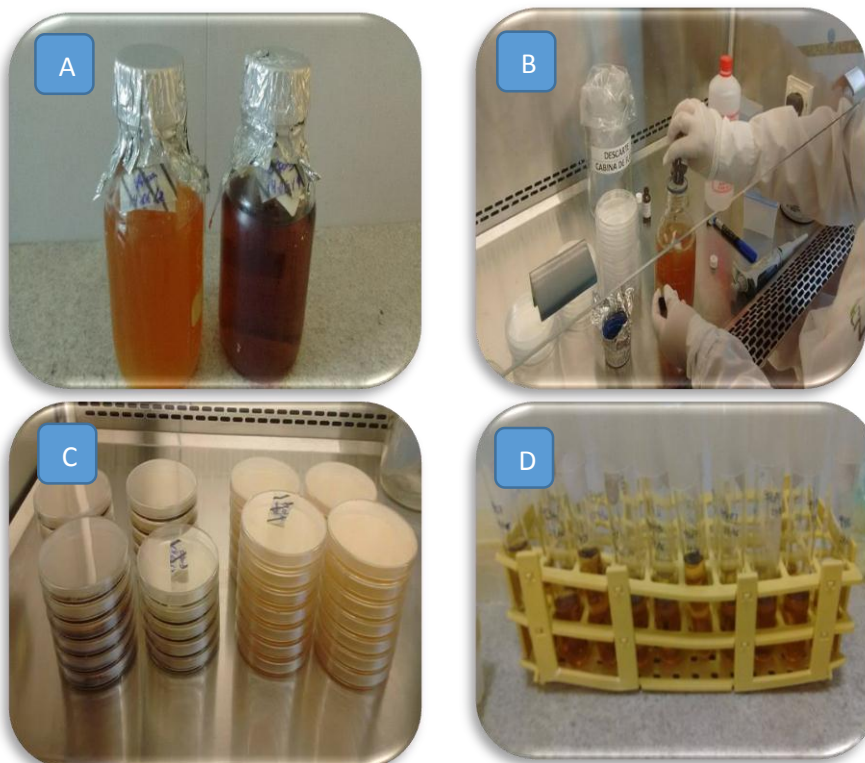
16. Institut luxembourgeois de la normalización, de l'accréditation, de la sécurité et qualité des produits et services. NTP ISO11290-1:2017 Microbiología de los alimentos para consumo humano y animal. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*.
17. Jay, J., Loessner, M. y Golden, D. (2009). Microbiología Moderna de los Alimentos. 5ª Edición. España: Editorial Acribia S.A.
18. Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2004). *Biología de los Microorganismos*. 10ª Edición. Madrid - España: Editorial Pearson Prentice Hall.
19. Martino, E., (2007). *Listeria monocytogenes* en repollo y lechuga como vehículos de transmisión de listeriosis humana. Mercados La Hermelinda, Central y Palermo de Trujillo, Perú. 2006 – 2007 Tesis para optar el grado de Doctorado. Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo.
20. Martino, T., Lemus, D., Leyva, V., Tejedor R., De los Reyes, M. y Soto P. (2008). Incidencia de *Listeria spp.* en hortalizas frescas. Revista Cubana de Salud (http://bvs.sld.cu/revistas/spu/vol34_4_08/spu09408.htm, consultado el 14 de marzo de 2011).
21. Martínez, L. y Cepeda, A., Andicoberry, C., Comité científico de la agencia española de seguridad alimentaria AESAN (2011) Estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. 55pp
22. Moreno, Y. y Mercado, P. Sensibilidad bacteriana de cultivos de *Listeria spp.* de lugares de expendio de pescado de los mercados de la ciudad Trujillo-Perú. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en la Universidad Nacional de Trujillo. 40pp
23. Norrung, B. y Andersen, J. (2000). Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. Letters in Applied Microbiology, 30(3), 228-232.

24. Organización De Las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Organización Mundial de la Salud (FAO_OMS) (2004), Caracterización de peligros de patógenos en alimentos y agua Roma
25. Pérez, E. y Chávez, M. (2012) Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en tomate, zanahoria, Lechuga y rabanito, expendidos en mercados de Trujillo-Perú. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en la Universidad Nacional de Trujillo.
26. Prompyme. (2007). Manual de Buenas Prácticas de Manipulaciones en personas dedicadas a la elaboración y expendio de alimentos preparados, en el distrito de los Olivos., Lima.
27. Rodríguez, R. (2007). Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *Listeria spp* aislada de productos cárnicos crudos de una planta procesadora en Bogotá - Pontificia Javeriana facultad de ciencias 2007.
28. Ruesca, N. (2012). *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos LPC- Resistencia a los antibióticos Tesis para obtener el grado de Maestría. Universidad de Zaragoza, Zaragoza– España.
29. Sánchez, F. (2003). Detección de *Listeria monocytogenes* y *Listeria spp* en puntos críticos establecidos en una planta procesadora de productos congelados. vol. IX Nº 1 2006.
30. Segura, R. y Castillo, M. (2014). Riesgo alimentario de *Listeria monocytogenes* en ensaladas de frutas y yogur natural, en la transmisión de listeriosis humana. 162pp
31. Schlech W, Lavigne P. y Bortolussi R. (1983) Epidemic listeriosis evidence for transmission by food. The New England Journal of Medicine. 198; 308 (4): 203-206.

32. Tapia, M. y Díaz, R. (2004). Consideraciones ecológicas y de inocuidad alimentaria en productos de origen vegetal. ArchLatinoamerNutr. Vol. 44: 232-241pp.
33. Téllez, S. (2010). Biofilms y su repercusión en la industria alimentaria. Centro de vigilancia sanitaria veterinaria Universidad Complutense (VISAVET)
34. Torres, K., Sierra, S., Poutou, R., Vera, H., Carrascal, A. y Mercado, M. (2004). Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. Revista Actualidad & Divulgación Científica, 7(1), 25-57pp
35. Vázquez, M., Kuhn, P., Chakraborty, G. y Dominguez, B. (2001) *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clinical Microbiology Reviews. 2001:14 (3) 564-584pp
36. Zulema, R., Poutou, R. y Carrascal, A. (2008). Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria spp.* Laboratorio de Microbiología de Alimentos. Pontificia Universidad Javeriana.

ANEXO N° 1

ACONDICIONAMIENTO DEL MEDIO DE CULTIVO



A= Agares después de esterilizados B= Agregar suplemento al medio de cultivo
C= Agar servido en Placas Petri D= Caldo Fraser en tubos de 10 ml

ANEXO 2.

CONTROL DE CALIDAD RESULTADOS PARA MÉTODO CUALITATIVO



A=Cepas certificadas ATCC B= Cepa liofilizada *Listeria monocytogenes*

ANEXO 3

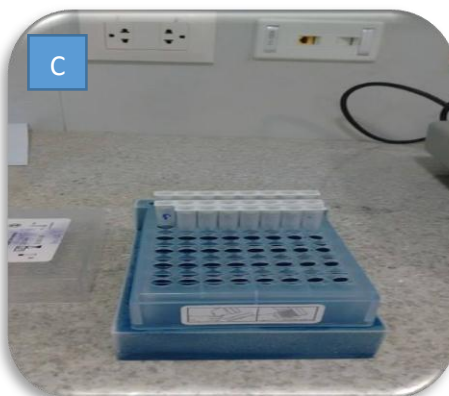
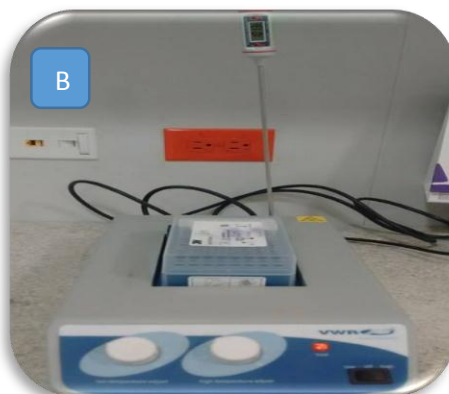
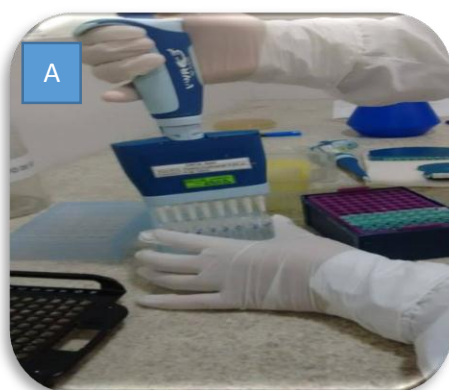
ACONDICIONAMIENTO DE LAS MUESTRAS



A= Desinfectar la tijera de corte y pesado de la muestra

ANEXO 4

DETECCIÓN MOLECULAR *Listeria spp*



A= Inoculación de la muestra en pocillos B= Fase de calentamiento
C= Fase de enfriamiento D= Fase de amplificación de las muestras en equipo



A= Muestra después de la incubación B= Siembra en placa petri



A= Kit APPI B= Inoculación de muestra en el Kit C= Observación de la muestra después de la incubación D= Lectura bioquímica de muestra presuntiva

ANEXO 7

TABLAS DE MEDIOS DE CULTIVO

Tabla Nº 01. Caldo Listeria

Fórmula (en gramos por litro)	
Tripteína soya caldo	30.0
Extracto de levadura	6.0
Fosfato monopotásico	1.35
Fosfato disódico	9.6
Piruvato de sodio	1.11
pH final: 7.3 ± 0.2	

Tabla Nº 02. Caldo Fraser

Composición (g/l):	
Esculina	1,0
Extracto de Levadura	5,0
Extracto de Carne	5,0
Litio Cloruro	3,0
Potasio <i>di</i> -Hidrógeno Fosfato	1,35
Proteosa Peptona	5,0
Sodio Cloruro	20,0
<i>di</i> -Sodio Fosfato	12,0
Triptona	5,0
pH: 7,2 ± 0,2	

Tabla Nº 03. Agar ALOA

Composición (g/l):	
Peptona de Carne	18,00
Litio Cloruro	10,00
Extracto de Levadura	10,00
Triptona	6,00
Sodio Cloruro	5,00
di-Sodio Hidrógeno Fosfato anhidro	2,50
Glucosa	2,00
Sodio Piruvato	2,00
Magnesio Glicerofosfato	1,00
Magnesio Sulfato	0,50
X-Glucosido	0,05
Agar Bacteriológico	13,50
pH: 7,2 ± 0,2	

Tabla Nº 04. Agar OXFORD

Composición (g/l):	
Peptona de carne	23,00
Almidón de maíz	1,00
Cloruro sódico	5,00
Esculina	1,00
Citrato férrico amónico	0,50
Cloruro de Litio	15,00
Agar-agar	14,00
pH: 7,0 ± 0,2	

Tabla Nº 05. Agar TSAYE

Composición (g/l):	
Triptona	17,00
Extracto de Levadura	6,00
Cloruro sódico	5,00
Peptona de Soja	3,00
Fosfato di Potásico	2,50
Glucosa Monohidratada	2,50
Agar-agar	15,00
pH 7.3 ± 0.2 a 25°C	

ANEXO 8

PROGRAMAS PARA RECOPIACION DE DATOS

3M Molecular Detection System

Run Report

Run ID	05052016(3)	Run Date	5/5/2016 4:39:28 PM
Run Status	Completed	User	ADMIN
Technician	ADMIN	Report By	ADMIN
Run Comment		Instrument	0212010132-212010132

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

A=Lectura de corrida de muestras



API

- API 10S
- API 20 A
- API 20 C AUX
- API 20 E
- API 20 NE
- API 20 STREP
- API 50 CHB
- API 50 CHE
- API 50 CHL
- API CAMPY
- API CANDIDA
- API CORYNE
- API LISTERIA
- API NH
- API STAPH
- RAPID 20 E

ID32

API LISTERIA V2.0 [Impresora](#) [Exportar](#) [Nuevo test](#) [Modificar](#)

REFERENCIA	FECHA
<input type="text"/>	<input type="text" value="29/05/15"/>
COMENTARIO	
<input type="text"/>	

IDENTIFICACION ACEPTABLE									
Galería	API LISTERIA V2.0								
Perfil	2 7 3 0								
Nota									
Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra						
Listeria ivanovii	99.7	0.13	DIM	88%	RHA	4%	G1P	91%	
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra						
Listeria grayi	0.1	0.0	DIM	99%	oMAN 99%	DXYL	1%	RHA	16%

B=Reporte de identificación de especies

TOTAL DE MUESTRAS ANALIZADAS

Nº	Fecha de análisis	Variedad	Fecha de recepción	Fecha de Producción	Hora	Resultado	Determinación de especie
3	03.12.15	PALTA HASS	1.12.2015	16/07/2015	9:10 a.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
11	03.12.15	PALTA HASS	3.12.2015	16/07/2015	17:10 p.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
14	04.12.15	PALTA HASS	4.12.2015	16/07/2015	7:35 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
17	04.12.15	PALTA HASS	4.12.2015	16/07/2015	10:35 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
19	04.12.15	PALTA HASS	4.12.2015	16/07/2015	12:35 p.m.	Presencia	<i>L. ivanovii</i>
23	04.12.15	PALTA HASS	4.12.2015	16/07/2015	16:35 p.m.	Presencia	<i>L. ivanovii</i>
27	7.12.2015	PALTA HASS	5.12.2015	5/12/2015	7:15 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
30	7.12.2015	PALTA HASS	5.12.2015	25/08/2015	08:400 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
41	7.12.2015	PALTA HASS	5.12.2015	25/08/2015	19:40 p.m.	Presencia	<i>Listeria ivanovii</i>
42	7.12.2015	PALTA HASS	5.12.2015	18/07/2015	20:40 p.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
43	7.12.2015	PALTA HASS	5.12.2015	25/08/2015	21:40 p.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
44	7.12.2015	PALTA HASS	5.12.2015	25/08/2015	22:40 p.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
56	09.12.15	PALTA HASS	09.12.15	19/11/2015	10:00 a.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
65	09.12.15	PALTA HASS	09.12.15	21/11/2015	11:00 a.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
66	09.12.15	PALTA HASS	9.12.2015	21/11/2015	11:00 a.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>

67	09.12.15	PALTA HASS	9.12.2015	21/11/2015	11:00 a.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
77	09.12.15	PALTA HASS	9.12.2015	25/08/2015	9:10 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
85	09.12.15	PALTA HASS	9.12.2015	20/07/2015	16:30 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
86	09.12.15	PALTA HASS	9.12.2015	18/07/2015	16:30 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
102	10.12.15	PALTA HASS	10.12.2015	20/07/2015	07:30	Presencia	<i>Listeria ivanovii</i>
108	10.12.15	PALTA HASS	10.12.2015	20/07/2015	15:30 a.m.	Presencia	<i>Listeria ivanovii</i>
115	12.12.15	PALTA HASS	12.12.2015	21/07/2015	8:35 a.m.	Presencia	<i>listeria innocua</i>
120	15.12.15	PALTA HASS	15.12.2015	22/07/2015	9:10 a.m.	Presencia	<i>listeria innocua</i>
125	16.12.15	PALTA HASS	16.12.2015	25/07/2015	8:30 a.m.	Presencia	<i>Listeria seeligeri</i>
127	16.12.15	PALTA HASS	16.12.2015	27/07/2015	13:45 p.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
130	17.12.15	PALTA HASS	17.12.2015	9/08/2015	8:30 a.m.	Presencia	<i>Listeria seeligeri</i>
141	29.02.16	PALTA	28.02.16	25.08.15	23:40 p.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
144	29.02.16	PALTA HASS	28.02.16	25.08.15	01:20 a. m	Presencia	<i>Listeria seeligeri</i>
150	01.03.16	PALTA HASS	29.02.2016	02.09.15	21:20 a.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
154	02.03.16	PALTA HASS	1.03.2016	28/08/2015	17:30 p.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
164	10.03.16	PALTA HASS	10.03.2016	09.01.2016	16:00 p.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>

173	10.03.16	PALTA HASS	10.03.2016	31.12.2015	11:00 p.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
187	10.03.16	PALTA HASS	10.03.2016	31.12.2015	9:10 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
191	10.03.16	PALTA HASS	10.03.2016	31.12.2015	10:20 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
192	10.03.16	PALTA HASS	10.03.2016	31.12.2015	11:00 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
199	12.03.16	PALTA HASS	12.03.2016	02.01.2016	11:50 a.m.	Presencia	<i>Listeria ivanovii</i>
200	16.03.16	PALTA HASS	16.03.2016	03.01.2016	16:00 p.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
203	16.03.16	PALTA HASS	15.03.2016	03.01.2016	17:00 p.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
206	16.03.16	PALTA HASS	15.03.2016	03.01.2016	18:00 p.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
212	17.03.16	PALTA HASS	15.03.2016	04.01.2016	14:00 p.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
219	17.03.16	PALTA HASS	15.03.2016	04.01.2016	16:20 p.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
226	17.03.16	PALTA HASS	15.03.2016	04.01.2016	18:00 p.m.	Presencia	<i>Listeria seeligeri</i>
237	18.03.16	PALTA HASS	17.03.2016	06.01.2016	13:00 a.m.	Presencia	<i>L. ivanovii</i>
255	07.04.16	PALTA HASS	06.04.16	10.01.2016	9:30 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
259	09.04.16	PALTA HASS	07.04.16	10.01.2016	13:00 p.m.	Presencia	<i>Listeria seeligeri</i>
264	09.04.16	PALTA HASS	07.04.16	10.01.2016	17:40 p.m.	Presencia	<i>Listeria ivanovii</i>

270	20.04.16	PALTA ETTINGER	19.04.16	11.01.2016	19:20 p.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
278	22.04.16	PALTA HASS	20.04.16	17.01.2016	1:20 a.m.	Presencia	<i>Listeria monocytogenes</i>
291	22.04.16	PALTA HASS	20.04.16	17.01.2016	15:20 p.m.	presencia	<i>Listeria seeligeri</i>
301	27.04.16	PALTA ETTINGER	25.04.2016	25.08.2015	16:00 p.m.	Presencia	<i>Listeria ivanovii</i>
311	30.04.16	PALTA HASS	29.04.16	28.08.2015	11:20 a.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
324	06.05.16	PALTA HASS	5.05.2016	30.08.15	15:49 p.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>
338	10.05.16	PALTA HASS	9.05.2016	30.08.15	13:40 p.m.	Presencia	<i>Listeria innocua</i>