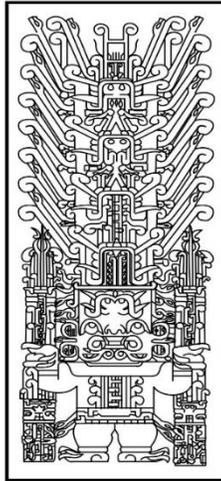


**UNIVERSIDAD NACIONAL FEDERICO VILLARREAL**  
**FACULTAD DE OCEANOGRAFÍA, PESQUERÍA, CIENCIAS ALIMENTARIAS Y ACUICULTURA**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA PESQUERA**



**PREVALENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN CONCHAS NEGRAS “*Anadara tuberculosa*”  
EN LOS MERCADOS DE ABASTO DEL DISTRITO DE CARABAYLLO**

**Tesis**

**Para optar al título profesional de:  
INGENIERO PESQUERO**

**Presentada por**

**LYNDA CRISS POMALAZA GUERRERO**

**LIMA – PERU**

**2018**

### **Dedicatoria**

Dedico de manera especial a mi madre Ysabel Guerrero López por el esfuerzo impresionante y el amor invaluable que hizo para poder educarme, además, por el apoyo incondicional en mi vida y por ser la mujer que soy hoy en día.

### **Agradecimientos**

A mi familia por ser siempre mi apoyo moral

A mi abuelo Silvestre Guerrero Rojas y tíos Alberto y Miguel por ser mi figura paterna y siempre enseñarme a luchar por mis metas.

A la Universidad Nacional Federico Villareal, por darme la oportunidad de lograr mi meta

A mi asesor Ing. Edmundo Guzmán Loyola, por el apoyo incondicional, y por sus buenos consejos.

A la laboratorista Milna García por el apoyo en el Laboratorio.

## RESUMEN

Se analizaron 105 muestras de conchas negras "*Anadara tuberculosa*" frescas de los Mercados de Abastos del distrito de Carabaylo, con el fin de determinar la prevalencia de la especie *Listeria monocytogenes*, con el método a utilizar la técnica según USDA- FSIS y el Instituto de Salud Pública de Chile PRT-712.03-086 que consta de cuatro fases: Pre-enriquecimiento, Enriquecimiento, Aislamiento, Identificación Bioquímicas y diferenciación hemolítica, para su confirmación.

Los hallazgos dieron una prevalencia de 2,86% de *Listeria monocytogenes* en las conchas negras, pero también se encontró diferencialmente *Listeria innocua* y como flora acompañante cepas del género *Micrococcus*.

Con estos resultados se pueden considerar a las conchas negras como un alimento de bajo riesgo para la salud pública, en lo que respecta a *Listeria monocytogenes* y, además, se estima que la fuente primaria de donde provienen estos mariscos y la manipulación normal a la que se someten contribuye poco a la contaminación de esta bacteria patógena y, por estas razones deben considerarse de buena calidad.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, conchas negras, listeriosis, prevalencia de *Listeria monocytogenes*.

## ABSTRACT

v

105 samples of black shells “*Anadara tuberculosa*” from the Markets of supply of the district Carabayllo were analyzed to determine the prevalence of the species *Listeria monocytogenes* using the USDA-FSIS technology method and the Institute de Public Health of Chile PRT-712.03-086 consisting of four phases: Pre-enrichment, Enrichment, Isolation, Biochemical Identification and hemolytic differentiation, for confirmation.

The findings showed a prevalence of 2.86% of *Listeria monocytogenes* in black shells, but also differently *Listeria innocua* and as accompanying flora strains of the genus *Micrococcus*.

With these results, black shells can be considered as a low-risk public health food for *Listeria monocytogenes* and, in addition, it is estimated that the primary source from which these seafoods originate and the normal handling are submitted contribute little to the contamination of this pathogenic bacteria and, for these reasons, should be considered of good quality

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, black shells, listeriosis, prevalence of *Listeria monocytogenes*.

## INDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>2</b>
1. El problema.....	2
1.1. Plantamiento del problema.....	2
1.1.1. Descripción del Problema.....	2
1.2. Objetivos .....	3
1.2.1. Objetivos generales.....	3
1.2.2. Objetivos específicos.....	3
1.3. Justificación.....	3
1.4. Importancia.....	4
<b>CAPITULO II</b> .....	<b>5</b>
2. Antecedentes .....	5
<b>CAPITULO III</b> .....	<b>8</b>
3. Generalidades.....	8
3.1.1. Género Listeria.....	8
3.1.2. Taxonomía .....	8
3.1.3. Características del genero <i>Listeria</i> y de la especie <i>Listeria monocytogenes</i> .....	9
3.1.4. Factores de virulencia de la <i>Listeria monocytogenes</i> .....	15
3.1.5. Serotipificación de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
3.1.6. Vías de transmisión de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
3.2. Listeriosis o toxiinfrcción alimentaria por <i>Listeria monocytogenes</i> .....	22
3.2.1. Poblaciones sensibles.....	22
3.2.2. Infección de la listeriosis.....	22
3.2.3. Patogenicidad.....	23

3.2.4.	Características de la enfermedad .....	23
3.2.5.	Distribución de la <i>Listeria monocytogenes</i> en la naturaleza y su importancia en los alimentos ...	24
3.2.6.	Incidencia de la listeriosis .....	26
3.3.	De las conchas negras .....	30
3.3.1.	Taxonomía de las conchas negras.....	30
3.3.2.	Biología .....	31
3.3.3.	Distribución y hábitat .....	32
3.3.4.	Manglares de Tumbes.....	33
3.3.5.	El Recurso “conchas negras” .....	33
3.3.6.	Modalidad de pesca .....	33
3.3.7.	Temporada de veda .....	35
3.3.8.	Problemática de las conchas negras.....	35
3.3.9.	Concha negra como alimento.....	35
<b>CAPÍTULO IV</b>	.....	<b>37</b>
4.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	37
4.1.1.	Materiales de vidrio .....	37
4.1.2.	Materiales de metal .....	38
4.1.3.	Materiales de madera.....	38
4.1.4.	Materiales de plástico.....	38
4.1.5.	Materiales desechables.....	39
4.1.6.	Equipos .....	39
4.1.7.	Medios de cultivos .....	39
4.1.8.	Reactivo e Indicadores .....	42
4.2.	Métodos .....	43
4.2.1.	Toma y homogenización de la muestra.....	43
4.2.2.	Análisis Microbiológico .....	43
4.2.3.	Enriquecimiento selectivo preliminar .....	44
4.2.4.	Enriquecimiento.....	44
4.2.5.	Aislamiento .....	45
4.2.6.	Conservación de cepas .....	46

4.2.7. Caracterización morfológica y enzimática .....	46
4.2.8. Caracterización bioquímica.....	47
4.2.9. Caracterización hemolítica.....	49
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>51</b>
5. Resultados .....	51
<b>CAPÍTULO VI.....</b>	<b>59</b>
6. Discusión.....	59
<b>CAPÍTULO VII.....</b>	<b>63</b>
7. Conclusiones.....	63
<b>CAPÍTULO VIII.....</b>	<b>64</b>
8. Recomendaciones.....	64
<b>CAPÍTULO IX.....</b>	<b>65</b>
9. Referencias bibliográficas .....	65

**ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla 1: Características diferenciadoras del género <i>Listeria</i> y <i>Brochothrix</i> . .....	12
Tabla 2: Condiciones de crecimiento de <i>Listeria</i> . .....	13
Tabla 3: Características de los cultivos y bioquímicas del género <i>Listeria</i> . .....	13
Tabla 4: Diferenciación y características de las especies del género <i>Listeria</i> . .....	14
Tabla 5: Factores de virulencia de la especie <i>Listeria monocytogenes</i> en el ciclo intercelular. ....	16
Tabla 6: Serología de las diferentes especies de <i>Listeria</i> . .....	17
Tabla 7: Brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos contaminados .....	28
Tabla 8: Incidencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos.....	29
Tabla 9: Estado de conservación y taxonomía .....	30
Tabla 10: Composición nutricional.....	36
Tabla 11: Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras “conchas negras” según el lugar de procedencia .....	53
Tabla 12: Resultados finales .....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1: Forma de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
Figura2: Esquema de listeriosis .....	21
Figura3: Concha negra .....	31
Figura4: Morfometría de la <i>Anadara tuberculosa</i> .....	33
Figura 5: Modalidad de pesca de la especie .....	34
Figura 6: Materiales de laboratorio .....	37
Figura 7: Medios de Cultivos .....	41
Figura 8: Viales para listeria .....	41
Figura 9: Carbohidratos .....	41
Figura 10: Reactivos e indicadores.....	42
Figura 11: Muestras pre- enriquecidas .....	44
Figura 12: Muestras enriquecidas.....	45
Figura 13: Muestra en Agar Palcam- Listeria .....	45
Figura 14: Muestra en TSA-YE.....	46
Figura 15: Gram (+).....	46
Figura 16: Diagrama de flujo para para la identificación del género <i>Listeria</i> .....	50
Figura 17: Número total de muestras de conchas negras " <i>Anadara tuberculosa</i> " que dieron positivo al aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> . .....	52
Figura 18: Comparación de resultados positivos – negativos para <i>listeria monocytogenes</i> conchas negras " <i>Anadara tuberculosa</i> ". .....	52
Figura 19: Resultados de las 3 etapas de caracterización .....	53
Figura 20: Colonias de <i>Listeria monocytogenes</i> en AGAR PALCAM .....	54
Figura 21: Prueba bioquímica "CATALASA (+)" .....	55
Figura 22: Prueba bioquímica "OXIDASA (+)" .....	55

Figura 23: Prueba bioquímica "Fermentación de carbohidratos" .....	56
Figura 24: Prueba bioquímica "Reducción de Nitratos a nitritos" .....	57
Figura 25: Prueba bioquímica "Rojo Metilo" .....	57
Figura 26: Prueba bioquímica "Voges Proskauer" .....	58
Figura 27: Prueba de hemólisis .....	58

## INTRODUCCIÓN

Existen muchos estudios microbiológicos que resaltan la presencia de la bacteria *Listeria monocytogenes* como patógena que se transmite por alimentos, como: leche cruda, quesos, hortalizas y productos listos para el consumo; pero existe poca información sobre la prevalencia de esta bacteria en la mayoría de estos productos y menos aún en los alimentos de origen acuático. Por esta razón, surgió la inquietud de hacer una investigación de esta bacteria en conchas negras, *Anadara tuberculosa*, para señalar el riesgo sanitario a los consumidores.

Este trabajo tiene como objetivo general determinar la prevalencia de la *Listeria monocytogenes* en las conchas negras que se consumen en Lima y provienen de los manglares de Tumbes; y la hipótesis que se plantea es que podrían estar altamente contaminadas y ser un peligro para la salud de consumidores cuando se consumen crudas, como normalmente se hacen cuando se preparan en cebiche.

El interés por un estudio microbiológico de las conchas negras radica en que son productos alimenticios de gran valor nutricional, ricos en proteínas, vitaminas y minerales, y constituyen un recurso hidrobiológico sobreexplotado y en estado vulnerable que debe repararse con mayor atención.

Las determinaciones microbiológicas se hicieron en los mariscos frescos y siguiendo la metodología internacional que consta de cinco etapas: pre-enriquecimiento, enriquecimiento, aislamiento de colonias típicas, identificación bioquímica y diferenciación hemolítica, para llegar hasta la tipificación de la especie *Listeria monocytogenes*.

Además, en el presente trabajo se revisa la literatura de la bacteria *Listeria monocytogenes*, la enfermedad que produce y el recurso conchas negras, para promover una cultura de inocuidad manteniendo un equilibrio productivo; por lo que se invita a leerlo y ser partícipe de un control productivo.

## CAPÍTULO I

### 1. El problema

#### 1.1. Planteamiento del problema

##### 1.1.1. Descripción del Problema

###### - Diagnóstico

Cuando los bivalvos en general son manipulados en forma artesanal sin control e inspección son una amenaza a la salud pública. Muchos de estos recursos hidrobiológicos se manipulan sin seguir ningún método, en el cuál no se tiene en cuenta las buenas prácticas de manufactura especialmente el almacenamiento de la *Anadara tuberculosa*, es por este motivo que se evaluarán en los Mercados de Abasto del Cercado de Lima. Además la cultura de inocuidad no es bien llevada por las distintas pescaderías. Debido a muchos patrones que cambiaron nuestro estilo de vida, por tanto en los hábitos de higiene, de consumo, todo suele ser muy rápido, el tiempo disponible para alimentarnos es muy breve. Este estilo de vida conspira todos los días contra la base misma de nuestra nutrición y una alimentación saludable. Por tanto, en la forma artesanal de manipulación de las conchas negras "*Anadara tuberculosa*" no se toman en cuenta las prevenciones de las amenazas de algún peligro biológico causado por desconocimiento, tampoco se realizan las buenas prácticas de higiene, ni existe estudios que establezcan la situación de la prevalencia de la *Listeria monocytogenes* en conchas negras "*Anadara Tuberculosa*", materia de estudio que evaluará en los diferentes Mercados de Abastos del Distrito de Carabaylo.

###### - Pronóstico

Gran parte de los alimentos provienen directa o indirectamente de la agricultura convencional y de la pesquería, estos durante el manipuleo se contaminan con microorganismos que son patógenos para la salud de la población consumidora, por tal motivo se dejaría consumir las conchas negras ya que lo verían como un riesgo para la salud. Por otro lado, la población consumidora introduciría otro tipo de carne a su

alimentación y dejaría de consumir las conchas negras, el cual contiene un aporte nutricional para la salud.

#### - **Control del pronóstico**

Es imprescindible detener la contaminación con *L. monocytogenes* en las conchas negras "*Anadara tuberculosa*" de lo contrario las enfermedades por consumo del bivalvo con el microorganismo en estudio puede convertirse en un gran problema para el sector de la producción, disminuyendo la aceptación en el consumo hasta el cierre definitivo y/o prohibición por parte del Ministerio de Salud del producto mencionado.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivos generales**

- Determinar la prevalencia de la *Listeria monocytogenes* en las conchas negras "*Anadara tuberculosa*".

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Evaluar las características microbiológicas de la *Listeria monocytogenes* en las conchas negras "*Anadara tuberculosa*".
- Evaluar las características bioquímicas de *Listeria monocytogenes* en las conchas negras "*Anadara tuberculosa*".

## **1.3. Justificación**

La presente investigación se enfocará en determinar la prevalencia de la *Listeria monocytogenes* en las conchas negras "*Anadara tuberculosa*" en los diferentes mercados

de abastos del distrito de Carabaylo, donde se realizará el aislamiento preventivo para asegurar si se encuentra la bacteria en él.

En la actualidad la demanda del consumo de recursos hidrobiológicos está aumentando y la población consumidora se encuentra expuesta a diferentes enfermedades; por otro lado, los vendedores de mercado no emplean controles de salubridad en el momento de la venta del bivalvo.

El estudio permitirá en la parte **metodológica**, se desea confirmar que la metodología en la identificación de la prevalencia de la *Listeria monocytogenes* es útil en la evaluación; y en lo **económico**, el deterioro de los alimentos ocasiona pérdidas, es costoso y puede influir negativamente en los consumidores.

Además, el resultado de la investigación será una respuesta y/o solución a problemas concretos con impacto económico, social y ambiental.

#### **1.4. Importancia**

La investigación tiene una aplicación concreta que servirá en la solución de problemas similares en otros mercados de abastos. El resultado final de la investigación será una respuesta y/o solución a problemas concretos con impacto económico, social y ambiental.

El resultado del estudio podría ser utilizado en otras investigaciones, además, en cuanto a su alcance, esta investigación abrirá nuevos caminos para estudios sustantivos que presenten situaciones similares a la que aquí se plantea, sirviendo como marco referencial.

## CAPITULO II

### 2. Antecedentes

De acuerdo a la revisión bibliográfica no se encontraron a nivel nacional e internacional tesis que traten las variables objeto del presente estudio; por otro lado, existen otros trabajos de investigación en los cuales se mencionan aspectos relacionados con el problema y que se dan a conocer en los párrafos siguientes.

***En antecedentes Internacionales se han reportado las siguientes investigaciones:***

***Figuera, B et., al.(2005). Crecimiento de Listeria monocytogenes en atún ahumado empacado al vacío.***

Las muestras obtenidas de una empresa atunera fueron trasladadas al Laboratorio de Tecnología de Alimentos del INIA-Sucre/Nueva Esparta, donde se les realizaron los análisis para determinar grado de frescura de la materia prima y procesamiento del producto. Los resultados sobre el crecimiento de *L. monocytogenes* durante refrigeración demostraron que el ahumado tuvo efecto inhibitor en la población inicial de *L. monocytogenes*, comenzando a observarse un ascenso después de los siete días de elaborados los productos.

**López Mendoza María Carmen, Alonso Sousa Santiago, Alapont Gutiérrez Cristina. (2016). Evaluación de la calidad microbiológica de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) depurado**

Las muestras se analizaron (crudas y después del tratamiento con vapor de agua) para determinar la prevalencia de *Escherichia coli*, aerobios mesófilos, *Staphylococcus aureus* y los microorganismos causantes de enfermedades *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus*. *E. coli* se encontró en el 25% de las muestras crudas y el 4% de las muestras cocidas. Se encontraron aeróbicos en el 89% de las muestras en bruto (más

de 1.000 ufc / g) y *S. aureus* en el 37,0%. Solo una muestra bruta fue positiva para *V. parahaemolyticus*. El porcentaje de resultados positivos fue cuatro veces más alto en la muestra de primavera que en la muestra de invierno. La contaminación fue más frecuente en la almeja lisa, y las muestras obtenidas los lunes se contaminaron con mayor frecuencia que las obtenidas en otros días de la semana.

**Otero Carballeria Andrés, Cepeda Sáez Alberto, Dominguez Rodriguez Lucas, Rodriguez Ferri Elpías, Zuzera Cosano Gonzalo, Alonso Andicoberry Cristina. (2009). Informe del comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo asociado a la presencia de *Listeria monocytogenes* en pescado fresco o congelado.**

AESAN realizó una evaluación del riesgo asociado a la presencia de LM, a falta de base normativa suficiente para adoptar decisiones de gestión ante la detección de partidas de pescado fresco o congelado contaminadas con *Listeria monocytogenes*, considera que, aunque la mayor parte del pescado fresco o congelado ha de estar libre de *Listeria monocytogenes*, no se puede descartar la presencia de una ligera contaminación con esta bacteria si el pescado procede de aguas contaminadas.

**González Pérez Pía Loreto. (2011). Cuantificación de *Listeria monocytogenes* en choritos (*Mytilus chilensis*) vivos y cocidos congelados para exportación, provenientes de Chiloé, x región de los lagos, Chile.**

Se analizaron 40 unidades de muestra de choritos vivos y 40 unidades de muestra de choritos cocidos congelados obtenidas en una planta procesadora ubicada en la Isla Grande de Chiloé, X Región de Chile, del total de unidades de muestras analizadas mostraron valores inferiores a 10 ufc/g de *L. monocytogenes*, lo que las hace aptas para el consumo humano según los estándares establecidos.

**En antecedentes nacionales se han reportado las siguientes investigaciones:**

**FUCHS, R. Y COL. (1991).** Se analizaron 32 muestras de cebiche, de las cuales el 75% dio resultado positivo para el género *Listeria sp*, y de este el 12,5% fue positivo para *Listeria monocytogenes*.

**RAMOS, I. (1991).** Aisló e identificó *Listeria sp* en productos hidrobiológicos frescos y procesados de nuestro litoral; de las 50 muestras analizadas 32 muestras fueron identificadas con *Listeria sp*, y 9 muestras como *Listeria monocytogenes*, se encontró una mayor incidencia de *listeria sp* en moluscos seguido en peces y crustáceos.

**GUERRA, E. y Col.(1996)** .En la Universidad de Piura determinaron la presencia de *Listeria monocytogenes* en filete de pescado fresco adquiridos del mercado de abastos de la ciudad , utilizando los métodos de selección en frío a 4°C lograron aislar 8 cepas

## CAPITULO III

### 3. Generalidades

En este presente capítulo se pretende dar a conocer sobre el microorganismo “*Listeria monocytogenes*”, la listeriosis y las conchas negras.

#### 3.1. Del Microorganismo

La *Listeria monocytogenes* es un patógeno intracelular que se encuentra presente en el consumo de alimentos contaminados por lo que es el agente causante de la listeriosis.

##### 3.1.1. Género Listeria

El género *Listeria* recibe su nombre gracias al científico Joseph Lister, pionero en el concepto de la cirugía aséptica y en la prevención de la sepsis quirúrgica (Ruíz *et al.*, 2008). En 1865 conoció la teoría germinal de Louis Pasteur sobre el origen microbiano de las enfermedades. Por entonces, la “enfermedad del hospital” (septicemia y otras infecciones post-operatorias) era una de las causas principales de muerte asociada a las operaciones quirúrgicas y los partos., Lister comprendió que las infecciones se debían a contaminación por microorganismos y propuso métodos para combatirla, basados en la limpieza de las manos e instrumentos de los cirujanos, el uso de fenol como antiséptico y la protección de las heridas por medio de algodones y vendas (Universidad CEU Cardenal Herrera, 2010). Respecto a la relación del género con Lister, la bacteria fue bautizada en honor de Lister por James Hunter Harvey Pirie (1877- 1965), bacteriólogo y geólogo escocés, que identificó la bacteria en 1927 y la denominó como *Listerella hepatolytica* (Universidad CEU Cardenal Herrera, 2010).

##### 3.1.2. Taxonomía

Los estudios taxonómicos numéricos junto con bioquímicos, composición de base de ADN y 16S rRNA secuencia de genes estudios muestran que todas las especies del género *Listeria* forman un homogéneo. Sobre la base de la secuenciación de los 16S RRNA gen (así como

otros genes), los miembros del género *Brochothrix* (*Brochothrix thermosphacta* y *Brochothrix campestris*) son los parientes más cercanos a *Listeria*, que es consistente con químicos y enfoques taxonómicos numéricos; estos dos géneros justifican la situación familiar como Listeriaceae (Wolfgang et al., 2009). La posición filogenética de *Listeria* es compatible con su bajo contenido de guanina + citosina (36 a 42%). En base a la hibridación ADN-ADN, el análisis de isoenzimas y la secuencia del ARNr 16S, el género *Listeria* comprende en la actualidad seis especies divididas en dos líneas de descendencia: *L. monocytogenes* y las especies emparentadas cercanamente *L. innocua*, *L. ivannovi* (subespecie *ivannovi* y subespecie *londoniensis*), *L. welshimeri*, y *L. seeligeri* y (ii) *L. grayi* (*L. murrayi* fue incluida recientemente en esta especie), las cuales han sido consideradas como especies (Pérez, 2013).

El casete de genes de virulencia relacionado con el ciclo de vida intracelular (LIPI-1) está presente en el genoma de las especies patogénicas, y en *L. seeligeri* en la cual existe una disrupción de la autorregulación positiva en el proceso de activación del LIPI-1; lo que hace que la cepa no sea patógena. Se ha encontrado un alto grado de homología en la secuencia del rDNA 16S, entre *L. monocytogenes* y *L. innocua* siendo las de mayor cercanía taxonómica consideradas apatógenas, mientras que *L. seeligeri*, *L. ivannovi* y *L. welshimeri* rara vez causan infección humana, reservando para *L. monocytogenes* la consideración de especie más importante (ICMSF, 1998). Dentro de las diferentes especies, *Listeria monocytogenes* es la única implicada en patología humana, ya que origina una enfermedad conocida como listeriosis (Centurión et al, 2004).

### **3.1.3. Características del género *Listeria* y de la especie *Listeria monocytogenes***

Las bacterias pueden habitar una amplia gama de nichos mediante la detección y la adaptación al medio ambiente fluctuaciones a través de cambios rápidos en la transcripción de genes y la expresión de proteína (Kamp et al, 2009). Morfológicamente, las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos cortos y regulares, de 0,4 a 0,5  $\mu\text{m}$  de ancho por 0,5 a 2,0  $\mu\text{m}$  de largo; pueden disponerse individualmente o en cadenas cortas, presentando a menudo formas en "y", aunque en cultivos envejecidos pueden aparecer en filamentos de 6 a 20  $\mu\text{m}$  de longitud (Blanco, 1994). Gram-positivo con tinción uniforme, pero algunas células, especialmente en las

colonias más viejas, pierden su capacidad para Gram. No es ácido rápido. No forma cápsula. No forman esporas. Todas las especies son móviles con flagelos peritricos cuando se cultiva < 30 ° C (Mclauchlin *et al.*, 2009), el flagelo bacteriano es una subestructura compleja que requiere el montaje de coordenadas de múltiples proteínas; por lo tanto, la mayoría de los sistemas bacterianos tienen un nivel jerárquico cascada que controla la expresión temporal y la producción de flagelos (Kamp *et al.*, 2009); por otro lado, se observa una expresión de alto nivel a 25 ° C, correspondiente a la temperatura a la que se observa motilidad de caída. Incluso en ausencia de motilidad activa, la fuerte inducción de flagelos (Mclauchlin *et al.*, 2009). La forma de *Listeria monocytogenes* se presenta en la figura 1.

Aerobios y facultativos anaeróbicos. Las colonias (24-48 h) son 0,5-1,5 mm de diámetro, redondas, translúcidas, bajo convexo con una superficie lisa y un margen entero, no pigmentado con un aspecto central cristalino (Mclauchlin *et al.*, 2009); sin embargo, al observarse a la lupa con epiiluminación, con un ángulo de la luz de 45°-60°, se observan reflejos de color azul-verdoso sobre una superficie finamente granular (Mclauchlin *et al.*, 2009). Por otro lado, los cultivos más antiguos (3-7 d) son más grandes, 3-5 mm de diámetro, tienen un aspecto más opaco, a veces con un centro hundido: pueden desarrollarse formas coloniales ásperas (Mclauchlin *et al.*, 2009); además, el organismo es psicrotrófica y crece en un rango de temperatura de 0 ° a 45 ° C, con un óptimo alrededor 37°C (Callejo *et al.*, 2008).

Todas las especies de *Listeria* crecen bien en la mayoría de las bacteriológicas no selectivas. La base de agar de sangre, nutrientes, triptosa y Triptosa de soja o infusión de corazón cerebro agares. El crecimiento es mejorado por la adición de un carbohidrato fermentable adecuado (0,2 - 1% (P / v) de glucosa es adecuada para todas las especies) sangre o suero (Mclauchlin *et al.*, 2009). Las características de los cultivos y bioquímicos del género *Listeria* se presenta en la tabla 3.

*L. monocytogenes* puede crecer a niveles de pH entre 4,4 y 9,4, y en actividades de agua  $\geq$  0,92 con cloruro de sodio (NaCl) como soluto (Callejo *et al.*, 2008), también, pueden resistir concentraciones de NaCl del 10-20% (Vásquez *et al.*, 2001). La gran mayoría de las cepas son

betahemolíticas, pero existen cepas que desarrollan tardíamente la beta-hemólisis y aún, cepas no hemolíticas (Marcenac, 1980). De las seis especies, sólo tres de ellas producen beta hemólisis en agar sangre: *L.monocytogenes*, *L.seeligeri*, *L. ivannovii*; mientras que esta última especie produce una zona amplia de hemólisis, *L.monocytogenes* produce zonas estrechas que generalmente no exceden el borde de la colonia. *L.monocytogenes* y *L. seeligeri* son positivas frente al test de CAMP con *Staphylococcus aureus*, mientras que *L. ivannovii* es positiva al test de CAMP con *Rodococcus equi* (Centurión y Takajara , 2004). Dadas estas características y el hecho de ser ubicua, *L. monocytogenes* tiene muchas oportunidades de entrar a las líneas de producción de alimentos y colonizar -en 1 a 10% causa portación transitoria- o enfermar a quienes los ingieren (Benadof, 2008). Las condiciones de crecimiento de *Listeria* se presentan en la Tabla 2.

*L. monocytogenes* es una bacteria notable que ha evolucionado durante un largo período para adquirir una diversa colección de moléculas, cada una con propiedades y funciones únicas, y contribuyendo al éxito de *L. monocytogenes* como agente intracelular patógeno. Tras la ingestión por el huésped a través de *L. monocytogenes* soporta la exposición a enzimas proteolíticas del huésped, el medio ácido del estómago (pH 2-0) sales biliares y ataques inflamatorios no específicos, en gran parte a través de las acciones de varios genes de estrés-respuesta (*opuCA*, *lmo1421* and *bsh*) y proteínas relacionadas (Dongyou Liu, 2006), además, *Listeria monocytogenes* es una bacteria grampositiva anaerobia facultativa, intracelular, que puede causar infecciones invasivas muy graves en el hombre y los animales y sobrevivir sin dificultad en medios inanimados, adaptándose rápida y eficazmente a cambios extremos en las condiciones ambientales (Sánchez, et al. 2010). Es capaz de producir biofilm en alimentos, crece a temperaturas de refrigeración, resiste condiciones adversas de ph y altas concentraciones de NaCl; por lo que, la *Listeria monocytogenes* ha sido el agente causal de principales epidemias transmitidas por los alimentos (Wesley et al 1991); por otro lado, se debe saber el tipo y la extensión de la inhibición de *L. monocytogenes* depende del tipo de especie y temperatura de incubación (Bahk et al. , 1990).

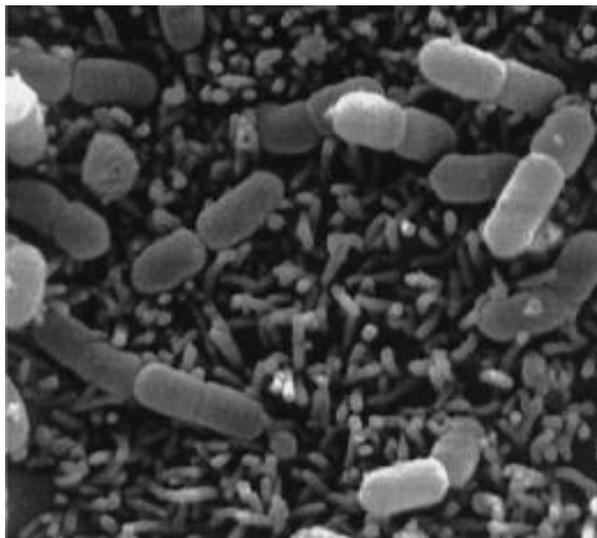


Figura1: Forma de *Listeria monocytogenes*.

Fuente: Vásquez , 2001

Tabla 1: Características diferenciadoras del género *Listeria* y *Brochothrix*.

	Género	
	<i>Listeria</i>	<i>Brochothrix</i>
Móvil	+	-
Requisito de oxígeno para el crecimiento a 35 ° C	Facultativo	Facultativo
Crecimiento a 35°C	+	-
Catalasa	+	+ <sup>f</sup>
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-
Ácido de la glucosa	+	+
Peptidoglicano de aminoácido	A	A
Mayor peptidoglicano	meso- DAP	meso-DAP
Mayor menaquinona	MK-7	MK-7
Tipo de ácido graso k,l	S,A,I	S,A,I
Mol% G+C	36 - 38	35.6 - 36.1

Fuente: *Adaptado de Mclauchlin et al., 2009.*

Tabla 2: Condiciones de crecimiento de *Listeria*.

	Mínimo	Óptimo	Máximo
Temperatura	-1	30 - 37	45
pH	4,0	6,0 – 8,0	9,6
Actividad del agua	0,90	0,97	--
Na Cl	< 0,5	N/A	12 - 16

Fuente: Erika,2013.

Tabla 3: Características de los cultivos y bioquímicas del genero *Listeria*.

Características	Reacción
Actividad de la catalasa	+
Necesidad de oxígeno	Facultativo
Crecimiento a 35°C	+
Movilidad a 22°C	+
Movilidad a 37°C	-

Fuente: ICMSF ,1998.

Tabla 4: Diferenciación y características de las especies del género *Listeria*.

Características	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
<b>β- Hemolisis</b>	+	-	+	+	-	-
<b>Prueba CAMP</b>						
<i>Rhodococcus equi</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	-	-	+	-	-
<b>Producción de ácidos</b>						
d-Manitol	-	-	-	-	-	+
d-Xilosa	-	-	+	+	+	-
l-Arabinosa	-	-	-	d	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	-
Glicerol	+	+	+	+	+	+
<b>Reducción de nitratos a nitritos</b>						
	-	-	-	-	-	-
<b>Voges Proskauer</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Rojo metilo</b>	+	+	+	+	+	+

Fuente: Adaptado de Mclauchlin et al., 2009.

Las características bioquímicas generales son: catalasa positiva, oxidase negativa, citocromos producidos. El metabolismo fermentativo de la glucosa produce producción de principalmente ácido L (+) - láctico. Ácido pero sin gas producido a partir de un número de otros azúcares, positivo de rojo de Metilo, positivo de Voges-Proskauer. Se requieren factores de crecimiento orgánicos. Indol no es Producido. Esculina y hipurato sódico son hidrolizados. La urea no se

hidroliza. La gelatina, la caseína y la leche no se hidrolizan. Aeróbicamente, todas las especies crecen sobre la glucosa, formando ácido láctico y / o ácido acético, y la maltosa y la lactosa apoyan el crecimiento de algunas cepas, pero la sacarosa no apoyar el crecimiento de cualquier cepa sometida a ensayo (Wong, 2005). La Tabla 4 presenta las principales características de las especies de *Listeria*.

### **3.1.4. Factores de virulencia de la *Listeria monocytogenes***

Desde finales de 1980, los estudios realizados en biología celular combinado con biología molecular y genómica han elucidado la elegante estrategia utilizada por *L. monocytogenes* para ingresar al hospedero, multiplicarse y propagarse entre célula-célula. Estos estudios identificaron y caracterizaron los factores de virulencia involucrados en el ciclo intracelular además, de los mecanismos de regulación que modulan la virulencia. Por otra parte, se estableció a *L. monocytogenes* como un organismo modelo para el estudio de la interacción patógeno-hospedero (Vera *et al.*, 2013).

Los avances en las técnicas de biología molecular han permitido identificar diversos factores de virulencia implicados en procesos clave del ciclo intracelular de esta bacteria. Estos factores de virulencia, involucrados en: la invasión de la célula blanco, el escape del fagolisosoma y el traspaso de célula a célula (Larrain, 2008).

Además, el factor de virulencia más importante relacionado con *L. monocytogenes* es la listeriolisina O (LLO), que es producida por todas las cepas virulentas de esta especie, es responsable de la hemólisis en los eritrocitos y de la destrucción de las células fagocitarias (Pérez, 2013). La tabla 5 muestra los factores de virulencia de la especie *Listeria monocytogenes* en el ciclo intercelular.

Tabla 5: Factores de virulencia de la especie *Listeria monocytogenes* en el ciclo intercelular.

Locación del cromosoma	Producto del gen	Función
LIPI- 1	O (LLO)	Lisis del fagosoma
	C (PI-PLC)	
	C (PC-PLC)	
	Mpl	Procesa al precursor PC-PLC a su forma madura
	A (PrfA)	Requerida para el factor de virulencia de <i>L. monocytogenes</i>
	Proteína inductora	Participa en la movilidad intra-celular
Exterior LIPI-1	Proteína transportadora	Requerido para el crecimiento intracelular
	A (InIA)	Participa en la invasión celular
	B (InIB)	Molécula señalizadora y participa en la invasión celular
	C (InIC)	Proteína secretada, contribuye a la virulencia de <i>Listeria</i>
	J (InIJ)	Adhesión celular, contribuye a la virulencia de <i>Listeria</i>

Fuente: Vera *et al.*, 2013.

### 3.1.5. Serotipificación de *Listeria monocytogenes*

Las cepas de *Listeria* pueden asignarse a 13 serotipos diferentes, basándose en su combinación de antígenos somático (O) y flagelar (H). Aunque todas ellas se consideran patógenos potenciales, la mayoría (>95%) de los aislamientos clínicos humanos, pertenecen a tres serotipos: 1/2a, 1/2b, y 4b. Comparado con otros métodos de tipificación, la serotipificación presenta un poder de discriminación bajo, pero puede proporcionar una información valiosa para facilitar el descarte de aislamientos que no forman parte del brote. Frecuentemente, los aislamientos procedentes de alimentos o de fuentes medioambientales no son tipificables con los antisueros de tipificación estándar (OIE, 2008).

Otras serovariedades, como el 1/2c, ha sido encontrada como contaminantes de alimentos. Algunas de estas serovariedades son compartidas por *L. innocua* y por *L. seeligeri*. *L. innocua* está representada sólo por tres serovariedades y es considerada una variante no patógena de *L. monocytogenes*. Entre las serovariedades asociadas a listeriosis, las cepas 4b causan más del 50% de los casos en todo el mundo, pero las cepas de grupo antigénico 1/2 (1/2a, 1/2b y 1/2c) predominan en los aislamientos a partir de alimentos; esto sugiere que las cepas serotipo 4b están más adaptadas a tejidos de hospedero mamífero que las cepas del serogrupo 1/2. (Torres *et al.*, 2005). La tabla 6 presenta la serología de las diferentes especies de *Listeria*.

**Tabla 6: Serología de las diferentes especies de *Listeria*.**

Especie	Serovariedades
<i>Listeria monocytogenes</i>	1/2a , 1/2b , 1/2c , 3a , 3b , 3c , 4a , 4ab , 4b , 4c , 4d , 4e, "7"
<i>Listeria ivanovii</i>	5
<i>Listeria innocua</i>	4ab , 6a , 6b , ln a
<i>Listeria welshimeri</i>	6a, 6b
<i>Listeria seeligeri</i>	1/2b , 4c , 4d , 6b , ln

Fuente: Torres *et al.*, 2005.

### 3.1.6. Vías de transmisión de *Listeria monocytogenes*

El principal mecanismo de transmisión de *L. monocytogenes* es la vía digestiva, mediante la ingestión de los alimentos contaminados. Existe una gran variedad de alimentos susceptibles de contaminación entre los que cabe destacar alimentos crudos o curados de origen animal (patés, embutidos, carne cruda), alimentos sin lavar como vegetales o fruta, productos lácteos sin pasteurizar (queso, leche) y alimentos preparados. Otros mecanismos de transmisión son la vía transplacentaria (madre-feto durante el embarazo), la vía perinatal (al neonato durante el nacimiento), por el contacto con objetos contaminados o por ascenso de la infección de la colonización vaginal en el embarazo. No está establecida la transmisión de persona a persona. La transmisión zoonótica por contacto directo con animales infectados durante el parto de vacas y ovejas es muy rara: siendo habitual la transmisión zoonótica, sobretudo del ganado, a partir del ambiente contaminado en que se procesan los alimentos (Parrilla, 2011).

La bacteria *L. monocytogenes* se puede transmitir al ser humano por varias vías:

1. A través del consumo de alimentos contaminados con dicha bacteria. Actualmente se reconoce que la mayoría de los casos de listeriosis humana son de transmisión alimentaria (99%) por falta de higiene, contaminación cruzada, inadecuado procesado de los alimentos tanto en la transformación de los alimentos en la industria como en la preparación y cocinado de los alimentos en el hogar.
2. Vertical: de madre embarazada a feto.
3. Zoonótico: por contacto con animales enfermos, lo cual es poco frecuente, como son los casos de veterinarios y ganaderos después del parto de un animal infectado sin protección.
4. Nosocomial (adquisición hospitalaria): en obstetricia y ginecología es muy poco frecuente.

(Elika, 2013)

### **3.2. Listeriosis o toxiinfección alimentaria por *Listeria monocytogenes***

La listeriosis ha surgido como una enfermedad muy importante de origen alimentario en las últimas dos décadas (Medrano, et al, 2006); por lo que, la listeriosis es una zoonosis y enfermedad de origen alimentario, es decir que se transmite a los humanos a través del consumo de los productos alimenticios contaminados con *Listeria monocytogenes* (Elika2013), y ocurre usualmente vía intestinal (RENALOA, 2011).

La listeriosis es una enfermedad infrecuente pero seria, de elevada tasa de mortalidad (20-30%) en sectores poblacionales de elevada susceptibilidad, comparada a la de otras toxiinfecciones alimentarias (Elika, 2013); por otro lado, la listeriosis invasiva se refiere a los casos en que una infección inicial del tejido intestinal por *L. monocytogenes* deriva en la invasión de partes del organismo que habitualmente son estériles, como el útero grávido, el sistema nervioso central o la sangre, o combinaciones de éstos (FAO/OMS, 2004).

La mayoría de casos de listeriosis ocurren en mujeres embarazadas o individuos con una predisposición a la enfermedad (tal como alcoholismo, diabetes, cirrosis) o un sistema inmune debilitado resultado de una enfermedad (SIDA) o tratamiento inmunosupresivo, se incluye en este último grupo los pacientes que están sufriendo leucemia u otros desórdenes neoplásicos, los pacientes que reciben tratamientos prolongados con corticosteroides o drogas citotóxicas o ambos, y pacientes con tratamientos como hemodiálisis. Aunque se ha reportado que la listeriosis es poco frecuente en pacientes con VIH y existen únicamente alrededor de unos 50 casos publicados (Pérez, 2013) ,por eso, la sitúan entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia social y económica (FAO/OMS, 2004).

Sin embargo, los casos de listeriosis se producen principalmente en países industrializados, donde la producción masiva obliga a largos periodos de refrigeración de los alimentos, lo cual constituye un grave problema para empresas alimentarias debido a la dificultad que representa su control en las plantas de procesado (Donnelly *et al.*, 1992)

Por otro lado, existen otros tipos de listeriosis que se presentan a continuación:

### **a) Listeriosis feto materna y listeriosis neonatal**

La infección se produce por invasión del feto por vía placentaria y desarrollo de corioamnionitis. Como consecuencia, puede ocurrir el aborto, generalmente a partir de los 5 meses de embarazo, el parto prematuro o el nacimiento a término con infección generalizada del neonato, síndrome conocido como granulomatosis infantisepsica (Callejo *et al.*, 2008). Se caracteriza por la presencia de microabscesos piogranulomatosos diseminados en el cuerpo y con alta mortalidad (Klatt *et al.*, 1986). En la madre, la infección es generalmente asintomática y puede presentarse como un síndrome gripal leve con escalofríos, fatiga, dolor de cabeza, muscular y articular alrededor de 2 a 14 días antes del aborto (Callejo *et al.*, 2008).

La listeriosis neonatal tardía se observa con menos frecuencia. Generalmente ocurre de 1 a 8 semanas posteriores al parto y se presenta con un síndrome febril acompañado por meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía. La vía de contaminación del neonato es por aspiración de exudados maternos contaminados durante el parto. También se han registrado casos intrahospitalarios en unidades de neonatología por transmisión horizontal a través de instrumental y las manos del personal de salud (Farber *et al.*, 1991). La mortalidad de la listeriosis neonatal tardía es más baja (10 al 20%), pero al igual que la listeriosis temprana, puede dejar secuelas tales como hidrocefalia y retraso psicomotor (Lorber, 1996).

### **b) Listeriosis del adulto**

La infección más frecuente en el adulto es la invasión del sistema nervioso central (SNC) (55 al 70% de los casos). Desarrolla generalmente como meningoencefalitis acompañada por cambios severos de la conciencia, desordenes del movimiento y en algunos casos parálisis de los nervios craneales. La mortalidad de la infección del SNC es del 20%, pero puede ser del 40 al 60% si está asociada a una enfermedad de base (Callejo *et al.*, 2008). En ciertos grupos de riesgo, como enfermos de cáncer, *L. monocytogenes* es la causa más frecuente de meningitis bacteriana (Lorber, 1996). Otra forma frecuente de listeriosis es la bacteriemia o septicemia que tiene una alta tasa de mortalidad (hasta el 70%), si está asociada a una enfermedad inmunosupresiva. Hay otras formas clínicas atípicas (5 al 10% de casos) tales como endocarditis, miocarditis, arteritis, neumonía, pleuritis, hepatitis, colecistitis, peritonitis,

abscesos localizados, artritis. En vacas la forma más frecuente es la mastitis (Blenden *et al.*, 1987). Investigaciones de brotes alimentarios han dado la evidencia de que un síndrome gastrointestinal es la manifestación clínica de la infección por *L. monocytogenes* (Aureli *et al.*, 2000). A continuación se presenta el esquema de la Listeriosis:

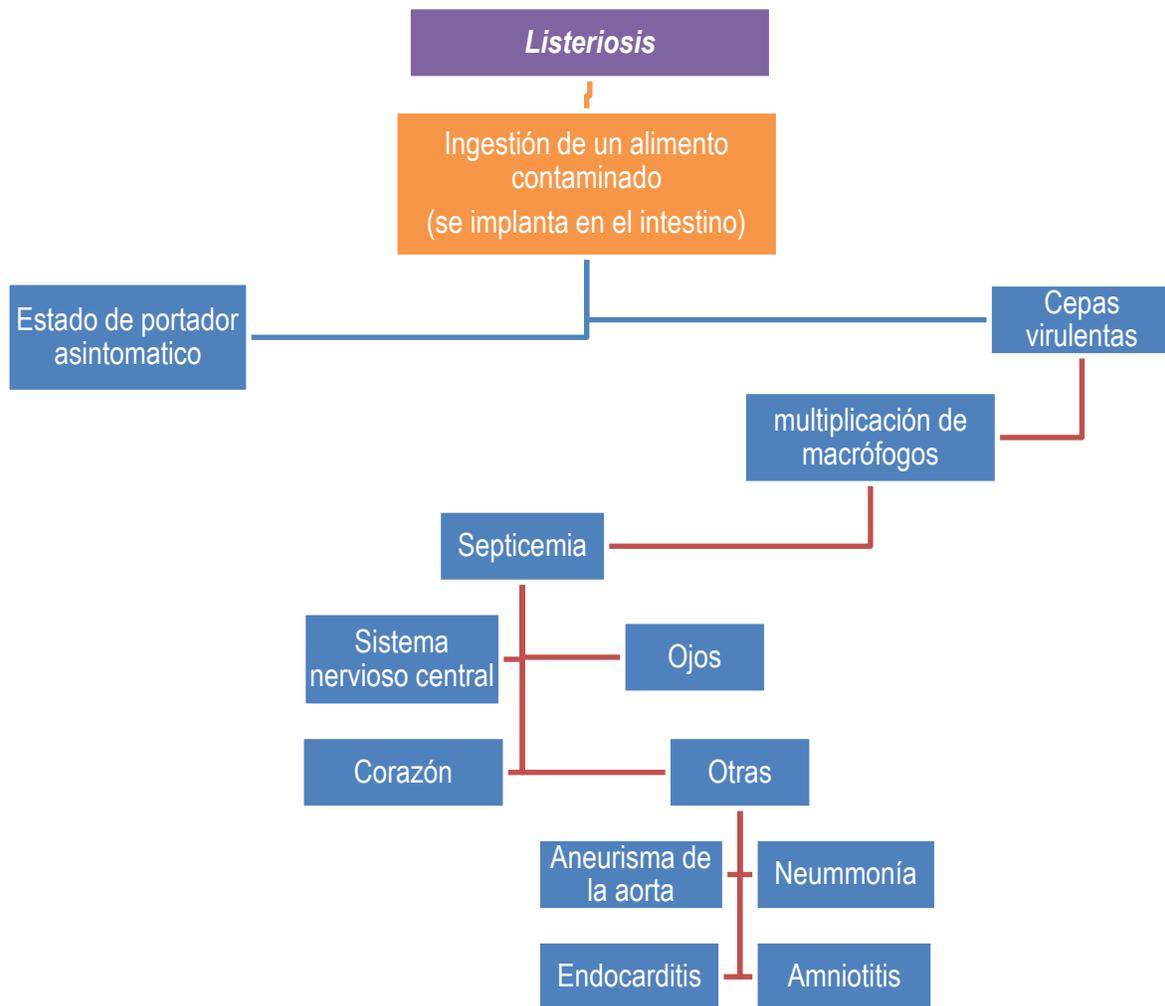


Figura2: Esquema de listeriosis.

Fuente: Adaptado de Centurión *et al.*, 2004; Sánchez *et al.*, 2010; Pérez, 2013; Sánchez *et al.*, 2010; y Elika, 2013

### 3.2.1. Poblaciones sensibles

La listeriosis es considerada como una infección oportunista que con mayor frecuencia afecta a mujeres embarazadas, fetos, recién nacidos, personas de edad avanzada, y persona con enfermedades subyacentes graves como por ejemplo aquellos con terapia inmunosupresivo, pacientes con SIDA y con condiciones crónicas que deterioran el sistema inmunitario como por ejemplo la cirrosis, trasplante de órganos y hemodiálisis (Centurión y Takajara, 2004).

Los recién nacidos pueden adquirir la infección a través de la madre de dos formas: Las madres embarazadas, que son colonizadas con la bacteria en el tracto digestivo tras ingesta de alimentos contaminados, pueden desarrollar una infección asintomática o una enfermedad parecida a la gripe con fiebre, mialgia o dolor de cabeza. Dicha bacteria es transmitida al feto a través de la placenta y las consecuencias para el feto son más graves, incluyendo aborto espontaneo, muerte del feto, nacimiento prematuro, septicemia neonatal grave y meningitis. Alternativamente, las madres pueden ser portadoras, en su tracto digestivo y región perianal, de *Listeria* y pueden ser portadoras, en su tracto respiratorio de sus hijos durante el alumbramiento; estos niños pueden desarrollar 2 ó 3 semanas más tarde una meningitis bacteriana (Centurión y Takajara, 2004).

En pacientes enfermos que reciben terapia inmunosupresora, se debilita la resistencia a la infección y también puede alterarse los mecanismos de defensa intestinal, lo que favorece la invasión de las listerias. Aunque en personas saludables pueden consumir alimentos contaminados sin llegar a enfermar, en ellos el riesgo de infección es mayor y pueden contraer listeriosis probablemente después de volver a comer alimentos contaminados con incluso una pequeña cantidad de bacteria (Centurión y Takajara, 2004).

### 3.2.2. Infección

El proceso de infección comprende varias etapas: adhesión e invasión de la célula hospedera, escape de la vacuola, multiplicación intracelular y proliferación extracelular. En cada una de estas etapas están involucrados múltiples factores de virulencia (Vera *et al.*,2016).

### 3.2.3. Patogenicidad

*L. monocytogenes* puede sobrevivir en el entorno gástrico, colonizar el intestino y cruzar la barrera intestinal, la hematoencefálica y la materno-fetal. Ha desarrollado mecanismos sofisticados que le permiten invadir y sobrevivir en una amplia variedad de células, incluso en las que normalmente no son fagocíticas, como células epiteliales y endoteliales y hepatocitos (Sánchez *et al.*, 2010).

Principalmente contiene una proteína denominada internalina la cual interactúa con el receptor de las células del huésped para la adhesión celular, esta se denomina E-cadherina la cual induce la fagocitosis, siendo estas específicas para cada tejido. La presencia de internalinas facilita la entrada del microorganismo a las células. El organismo reacciona creando una especie de fagosoma con el fin de encapsular la bacteria pero esta produce listeriolisina O y fosfolipasas C que le permiten destruir el fagosoma hidrolizando los lípidos de su membrana. Esta listeriolisina está codificada por el gen *hly*. Al estar dentro del citosol *L. monocytogenes* utiliza una proteína de superficie denominada ActA la cual genera la polimerización intracelular de la actina (Wikipedia, 2017). Parece que el proceso inicial que *Listeria* utiliza para regular la expresión de los productos de sus genes de virulencia es el control transcripcional del gen *prfA*. La exposición de la bacteria a determinadas condiciones de estrés (por ejemplo al pH gástrico o la baja concentración de iones y carbohidratos en el interior de las vacuolas fagocíticas) desencadena la expresión de dichos productos (Sánchez *et al.*, 2010).

### 3.2.4. Características de la enfermedad

La presentación clínica de la listeriosis es variable en relación al huésped: en individuos previamente sanos por lo general causa diarrea autolimitada o incluso puede ser asintomática; sin embargo, en inmunodeprimidos, puede presentarse como una enfermedad invasiva. Se puede agrupar en tres presentaciones principales: bacteriemia, infección del sistema nervioso central y listeriosis materno-fetal. En los adultos, la forma invasiva más común de listeriosis es la meningitis y la encefalitis. Sin embargo, la manifestación más frecuente en individuos inmunocomprometidos es la bacteriemia sin foco evidente y por lo tanto es muy difícil de sospechar y en consecuencia diagnosticar una bacteriemia por *L. monocytogenes*. Las

manifestaciones clínicas en general son escasas, siendo los pacientes paucisintomáticos (FOD, esplenomegalia, etc.). En particular la romboencefalitis fue descrita por primera vez en 1957 por Eck y suele aparecer en pacientes previamente sanos, contrariamente a la meningitis. Compromete primariamente el bulbo, protuberancia y el cerebelo, con infiltrados que frecuentemente afectan los núcleos y tractos de los nervios craneales. El curso clínico se inicia con pródromos inespecíficos como cefalea, malestar general, náuseas, vómito y fiebre, que duran de 4 a 10 días, seguidos de una disfunción progresiva del tronco encefálico con compromiso de los pares craneales, hemiparesia o cuadriparesia, déficit sensitivo, insuficiencia respiratoria, deterioro de vigilia y, algunas veces, convulsiones. En cuanto a la listeriosis materno-fetal, se presenta en general en el tercer trimestre, pudiendo cursar como un cuadro pseudogripal de evolución favorable o tener una presentación más grave, aunque es poco frecuente el desenlace fatal en la madre. Sin embargo, si no se instaura el tratamiento adecuado puede producir una amnionitis e infección fetal que puede ser causa de aborto, óbito o parto prematuro de un neonato infectado con el cuadro clínico denominado granulomatosis infantiseptica. Las manifestaciones solo se producen cuando la infección se ha adquirido intraútero vía transplacentaria con una mortalidad cercana al 100%. Las formas localizadas son menos frecuentes, pudiendo presentarse tras un episodio de bacteriemia, describiéndose casos de endocarditis, aneurismas micóticos, artritis, osteomielitis, absceso intraabdominal (abscesos hepáticos o esplénicos o peritonitis), neumonía, osteomielitis y endoftalmitis. También se han descrito formas locales que afectan a la piel y mucosas (celulitis, conjuntivitis) en trabajadores de mataderos o en veterinarios, siendo en este caso la infección por contacto directo con tejidos o animales contaminados (Paciol *et al.*, 2016).

### **3.2.5. Distribución de la *Listeria monocytogenes* en la naturaleza y su importancia en los alimentos**

El principal reservorio del microorganismo lo constituyen el suelo, el forraje, el agua, el lodo y los ensilajes (granos, semillas). Al empleo estacional de los ensilajes como pienso, a menudo sigue una mayor incidencia de listeriosis en los animales. Otros reservorios son los mamíferos infectados, domésticos y salvajes, las aves de corral y las personas. El estado de portador fecal asintomático es común en el ser humano (hasta 10%) y ha sido mucho más frecuente en

trabajadores de rastros y en personal de laboratorio que manipula cultivos de *Listeria monocytogenes* (Chin, 2001). También se ha encontrado en aguas de desecho, en el suelo, en carne de aves frescas y congeladas, pescados, moluscos, crustáceos, productos lácteos como leche, quesos y helados, en productos cárnicos y frutas (Centurión y Takajara, 2004); sin embargo, a diferencia de muchos otros microorganismos patógenos que son transmitidos por los alimentos, *Listeria* tiende a multiplicarse en los alimentos refrigerados que están contaminados (Chin, 2001). Por consiguiente, los alimentos se pueden contaminar en cualquier eslabón de la cadena productiva (Seoane *et al.*, 2013).

Se sabe que la tierra es un reservorio natural de *L. monocytogenes*, además, es un microorganismo saprofítico que vive entre la planta y la tierra del medio ambiente con alta incidencia y además puede ser contraído por humanos y animales, vía muchas posibles rutas de varias fuentes. (Pérez ,2013); por otro lado, se encuentra en el intestino de animales y personas que actúan como portadores y, también, ampliamente distribuido en ambientes naturales como suelo, agua, efluentes, pastos y ensilados dónde sobreviven durante períodos extensos de tiempo. También se encuentra en el suelo, paredes, techos y equipos de plantas de procesamiento de alimentos, y se ha aislado de una gran variedad de alimentos listos para consumo (RTE) de origen vegetal, lácteo, marino o cárnico y en ensaladas y frutas. Los alimentos listos para consumo (RTE) se consideran como aquéllos preparados para su consumo directo sin necesidad de cocinado u otros tratamientos culinarios que reduzcan a un nivel aceptable la presencia de microorganismos preocupantes (Elika, 2006).

Además, dos propiedades de *L. monocytogenes* en particular contribuyen a su amplia distribución: (i) a pesar de no formar esporas, es capaz de sobrevivir durante períodos de tiempo prolongados en muchos medios diferentes; y (ii) es un organismo psicrótrofo (Pérez ,2013); por tanto, la probabilidad que la gran mayoría de alimentos crudos o ligeramente elaborados estén contaminados con la especie "*Listeria monocytogenes*", se debe esperar la presencia de este microorganismo en alimentos listos para consumo de esta naturaleza; por lo que, los alimentos listos para el consumo son un vector directo de la infección humana con *Listeria monocytogenes*.

### 3.2.6. Incidencia de la listeriosis

Aunque la mayoría de los casos de listeriosis se dan de forma esporádica, en los últimos años ha despertado un mayor interés debido a las epidemias ocurridas en distintos países asociados al consumo de determinados alimentos (Centurión y Takajara, 2004).

La listeriosis ha surgido como una enfermedad muy importante de origen alimentario en las últimas dos décadas; el primer brote estudiado ocurrió en 1981 en Nueva Escocia, Canadá, por ensalada de repollo contaminada (Medrano *et al.*, 2006). Durante los años 1989-1998 se notificaron a la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica a través del Sistema de Información Microbiológica, 208 casos de listeriosis. Ello supone 20,8 casos/año que divididos por la población total serían de unos  $4,81 \times 10^{-7}$  ó 0,48 casos por millón de habitantes y año (Elika, 2006).

Por otro lado, este patógeno cobra cada vez mayor importancia en salud pública a nivel mundial, y se conocen datos epidemiológicos de algunos países desarrollados (Medrano *et al.*, 2006), en los Estados Unidos la incidencia de casos que requieren hospitalización es de aproximadamente 1 por 200 000 habitantes. En general se manifiesta de manera esporádica; sin embargo, en años recientes se han identificado varios brotes en todas las estaciones del año. Cerca de 30% de los casos clínicos surgen en las tres primeras semanas de vida; en las mujeres adultas no embarazadas, la infección aparece especialmente después de los 40 años de edad. Se han notificado casos nosocomiales. En todas las edades se producen infecciones asintomáticas, aunque solo son de importancia durante el embarazo. La mujer puede abortar en cualquier momento del embarazo, pero principalmente en la segunda mitad. La infección perinatal se adquiere en el último trimestre. (Chin , 2001).

La incidencia anual de casos por listeriosis es muy baja. Por ejemplo en Europa los casos varían entre 0,3 y 7,5 por millón de personas (6,2 casos por millón de habitantes en Alemania en 2005), y 3 casos por millón en Australia (RENALOA, 2011); además, la listeriosis es denunciada principalmente en países industrializados, los predominios en África, Asia y América del sur, se desconocen o son bajos posiblemente debido a los modelos de consumo, diferentes hábitos

dietéticos, diferencias en la sensibilidad del hospedero, tecnologías diferentes, diferencias en la elaboración y almacenaje de los alimentos (Centurión y Takajara, 2004).

En otros países como Portugal se ha encontrado que cerca del 15% de los alimentos listos para el consumo están contaminados con *L. monocytogenes*. En Colombia se ha determinado que la incidencia de este microorganismo en quesos y leche no pasteurizada distribuida en Boyacá es muy alta (29,6 y 16%, respectivamente); en derivados cárnicos listos para el consumo también se ha encontrado una alta incidencia (24%) (Medrano *et al.*, 2006); en contraste, la listeriosis puede presentarse esporádicamente o en epidemias; en ambas situaciones, los alimentos contaminados son los principales vehículos de transmisión de *L. monocytogenes*. La leche, el queso, los vegetales frescos, la berza, el pollo, las setas, el pavo y muchos otros suelen ser los alimentos más frecuentemente implicados en ella. La incidencia anual por 100.000 habitantes puede variar del 0,3 al 0,8% y alcanzar un 5% durante algunos brotes epidémicos (Oteo *et al.*, 2004). La tabla 7 muestra los brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos contaminados.

A pesar de la relativamente baja incidencia de la enfermedad, la listeriosis es una enfermedad grave y esto se refleja en el alto índice de mortalidad en muchos episodios con un promedio de muertes de aproximadamente el 30% (Pérez, 2013). La tabla 8 muestra la incidencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos.

Tabla 7: Brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos contaminados

País	Año	Alimento	C/M	Serotipo
EUA	1983	Leche pasteurizada	49/14	4b
EUA	1985	Queso	142/48	4b
Londres	1990	Paté	300/0	4b
Francia	1992	Lengua de cerdo	279/88	4b
EUA	1998	Salchichas	108/14	4b
EUA	1999	Salchichas	101/21	1/2a
EUA	2000	Queso fresco	13/0	4b
EUA	2001	Carnes frías	28/0	1/2a
EUA	2002	Carnes frías	54/8	4b
EUA	2003	Queso fresco	13/1	4b
EUA	2005	Pollo a la parrilla	3/0	1/2b
EUA	2006	Queso	3/1	4b
EUA	2007	Leche	5/3	4b
EUA	2008	Ensalada de atún	5/3	1/2a
EUA	2011	Melón	147/33	NR
EUA	2012	Queso Ricota	22/4	NR
EUA	2013	Queso madurado	6/1	NR

NR: no reportado

C/M: casos/muertes

**Fuente:** Fuente: Salud pública México, Vol.56 nº.6 ( 2014)

Por otro lado, reportaron la presencia de *Listeria monocytogenes* en 12% (31/268) de las muestras de mariscos, 1% (2/256) de las muestras de queso fresco y 4% (21/603) de muestras de helados recolectados en el país de Chile.

Respecto a los productos salmón ahumado y vegetales frescos, reportaron la presencia de *Listeria monocytogenes* en 28% (28/100) de las muestras de salmón ahumado, y 2% (31/1750) de las muestras de vegetales frescos recolectados en el país de España.

Tabla 8: Incidencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos

<i>Alimento</i>	<i>Muestras/total</i>	<i>%</i>	<i>País</i>
Carne de res cruda	3/17	18	Portugal
	4/157	3	China
Carne de pollo cruda	9/15	60	Portugal
	57/158	36	España
Carne de puerco cruda	20/185	11	China
Pescado crudo	3/25	12	Portugal
Mariscos	31/268	12	Chile
	2/204	1	China
Salmón ahumado	28/100	28	España
Leche cruda	1/6	17	Portugal
Leche pasteurizada	0/28	28	Portugal
Queso fresco	2/50	4	Portugal
	2/256	1	Chile
Helado	21/603	4	Chile
Delicatesen	35/396	9	España
	23/634	4	Chile
Salchichas	7/93	8	EUA
	17/24	71	EUA
Vegetales frescos	31/1750	2	España
Vegetales congelados	35/271	13	Portugal

uente: Salud pública México, vol.56 nº.6 ( 2014)

### 3.3. De las conchas negras

En el presente ítem se pretende dar a conocer más sobre las características taxonómicas y biológicas, su habiudad y distribución, temporada de veda, su problemática sanitaria y sus beneficios alimenticios de la concha negra "*Anadara tuberculosa*".

#### 3.3.1. Taxonomía de las conchas negras

Dentro de la taxonomía de la concha negra "*Anadara tuberculosa*", es un molusco bivalvo del reino Animalia que pertenece al filo Mollusca de clase Bivalvia y orden Arcoida; por lo que, pertenece a la familia Arcidae, género *Anadara*, como se muestra en la Tabla 9. (Wikipedia, 2017).

Su nombre científico es *Anadara tuberculosa*; por otro lado, recibe los nombres vulgares de "piangua" (Colombia y Costa Rica), "concha negra" (Perú, Nicaragua y El Salvador), "curil" (El Salvador y Honduras), "chucheca" (Panamá, Puntarenas Costa Rica), "concha prieta" (Panamá), "concha" (Ecuador), y "patas de mula" (México) (Wikipedia, 2017).

El estado de conservación de la *Anadara tuberculosa* se encuentra en estado "vulnerable". Según UICN (Wikipedia, 2017).

**Tabla 9: Estado de conservación y taxonomía**

<b>Anadara tuberculosa</b>	
<b>Estado de conservación</b>	
Extinto	Amenazado
(EX)	(EW) (CR) (EN) (VU) (NT) (LC)
Preocupación menor	
Vulnerable (UICN)	
<b>Taxonomía</b>	
Reino:	Animalia
Filo:	Mollusca
Clase:	Bivalvia
Orden:	Arcoida
Familia:	Arcidae
Género:	<i>Anadara</i>
Especie:	<i>Anadara tuberculosa</i>

Fuente: [https://es.wikipedia.org/wiki/Anadara\\_tuberculosa](https://es.wikipedia.org/wiki/Anadara_tuberculosa)

### 3.3.2. Biología

Estos organismos presentan una concha equivalva, inequilateral, ovalada, gruesa, cuyo número de costillas radiales varía entre 33 y 37 las cuales son redondeadas y están relativamente juntas; el margen dorsal es algo angulado en ambos extremos. Sobre las costillas tiene nódulos o tubérculos, especialmente en el margen anterior. Periostraco marrón o negro, grueso, fuertemente arrugado, generalmente erosionado en los umbos, dejando al descubierto la concha blanca. La charnela es larga, delgada y recta con bordes internos fuertemente crenulados que corresponden a las costillas externas (Cano, 2011). La figura 4 muestra las valvas interior y exterior de la concha negra.

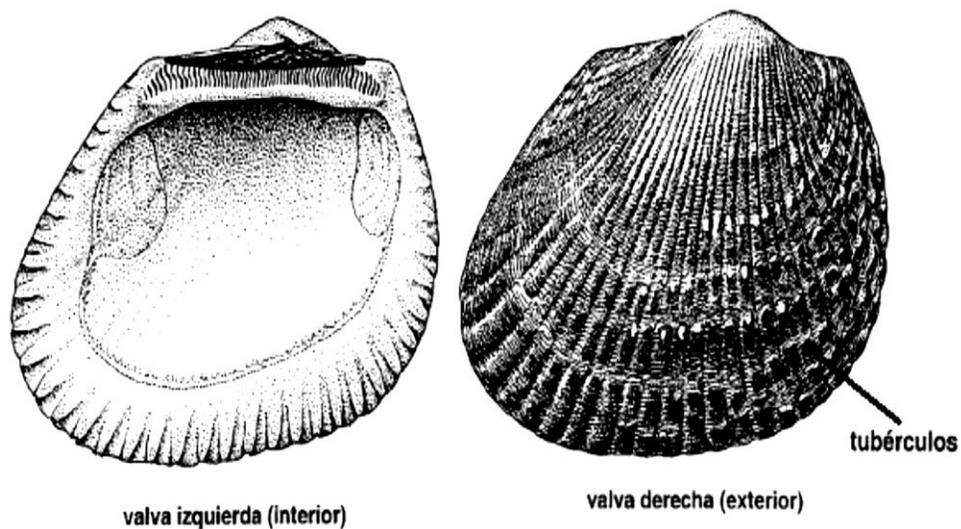
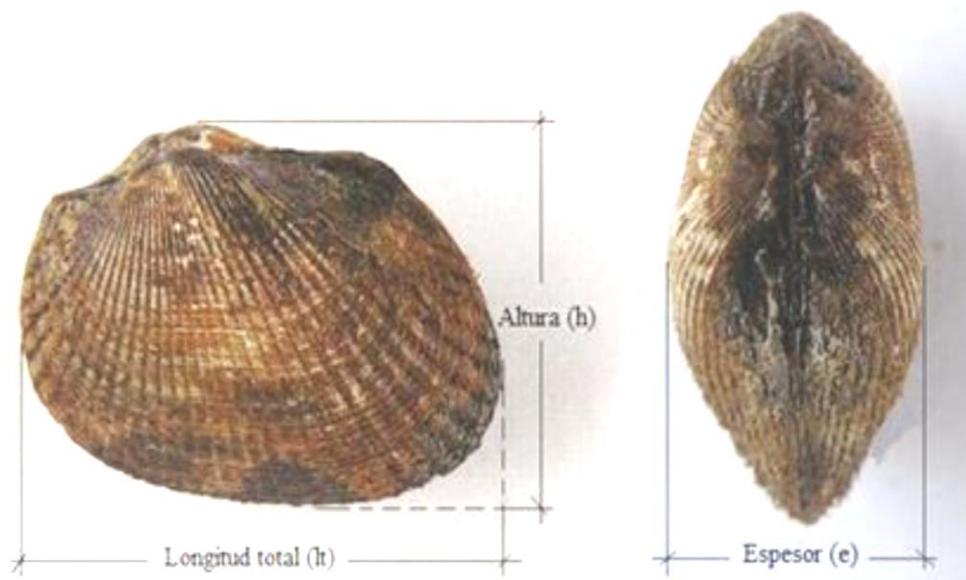


Figura3: Concha negra

Fuente: Cano,2011

Son filtradoras, participando las branquias, además de su función respiratoria, en la obtención de alimento (fitoplancton). Son organismos dioicos (presenta sexos separados); los hermafroditas son extremadamente raros (Imarpe, 2010).

La madurez sexual se alcanza en individuos entre 23,2 y los 26 mm de longitud total (Lazarich, 2009); por otro lado, la talla máxima es 8cm y común hasta 6 cm (Fischer, 1995). La morfometría de las conchas negras se presenta en la figura 5.



**Figura 4: Morfometría de la *Anadara tuberculosa***

**Fuente: Lazarich, 2009**

### 3.3.3. Distribución y Hábitat

#### - **Distribución:**

Es una de las especies representativas en los ecosistemas de manglar que se distribuyen entre Laguna Ballena (Golfo de California) a Tumbes (Perú) (Imarpe, 2010). En Baja California Sur, la zona de pesca tradicional para *A. tuberculosa* es Bahía Magdalena donde se captura artesanalmente (García *et al.*, 2008).

#### - **Habitad:**

Habita enterrada en el fango entre las raíces de mangle a profundidades de 10 a 30 cm. No se han encontrado especímenes en áreas desprovistas de vegetación (Imarpe, 2010), además, se halla en sustratos fangosos, arcillosos o limo-arcillosos, en la parte externa de los manglares la cual recibe inundación mareal diaria. Parece

existir una fuerte asociación entre las poblaciones de esta especie y las raíces del mangle *Rhizophora mangle* y *Pelliciera rhizophorae*, aunque solamente en ciertos rodales de esta especie se encuentran poblaciones importantes de este molusco (Lazarich, 2009).

#### **3.3.4. Manglares de Tumbes**

El ecosistema de los manglares de Tumbes, se localiza en la región Tumbes, en el litoral Sur de la frontera con Ecuador (Canal Internacional y Punta de Capones) hasta Playa Hermosa. El ecosistema de manglares, el cual comprende diversas zonas ecológicas caracterizadas por su clima, morfología costera, hidrología, flora y fauna particular y de gran importancia ecológica, económica y social. Dentro de la diversidad biológica de este ecosistema, se encuentran la especie de un alto valor socio-económico y alimenticio, destacando entre ellas el bivalvo *Anadara tuberculosa* conocido popularmente con el nombre de concha negra (Azabache, 2015).

#### **3.3.5. El Recurso “conchas negras”**

La concha negra *Anadara tuberculosa* es uno de los moluscos comerciales más importantes (Hivos People unlimeted, 2017).

Entre las características principales del ciclo vital de las especies del género *Anadara*, destacan los siguientes: hábito sedentario, tasa de crecimiento lento, fecundación externa con larva planctónica de vida corta, que luego se fijan al sustrato o sobre conchas adultas y desoves durante casi todo el año (Lazarich, 2009).

#### **3.3.6. Modalidad de pesca:**

Los pescadores en todos los países usualmente recolectan conchas durante 15-20 días al mes, pero no durante las mareas muertas o las lluvias fuertes, cuando esa actividad es difícil o imposible (Mackenzie *et al.*, 2006). La modalidad de pesca de la especie *Anadara tuberculosa* se presenta la figura 6.

La captura de este recurso es manual, el extractor, llamado comúnmente “conchero”, recorre los canales de marea e islas durante la marea baja en busca de la concha negra al tanteo (Imarpe, 2010), pero es desagradable caminar y atascarse en el fango flojo. Mientras caminan de un lugar a otro y se detienen para buscar apoyo en alguna raíz aérea de mangle para coleccionar las conchas, sus piernas se pueden hundir en el fango hasta la mitad de la pierna. Los pescadores hunden sus manos para buscar las conchas a tientas. Las manos penetran en el fango hasta la muñeca para coleccionar *Anadara tuberculosa* y comúnmente hasta el codo para coleccionar *Anadara similis* (Mackenzie *et al.*, 2006); por tanto, la modalidad de pesca para la concha negra es introduciendo las manos en el fango cerca del mangle e introduciendo los bivalvos capturados en una bolsa confeccionada con paño anchovetero, al que denominan “jicra”; a este procedimiento se le denomina “concheo” y se efectúa durante el día en un lapso de 3 a 4 horas durante la bajamar (Imarpe, 2010).

Después de la recolecta los pescadores regresan a sus casas con 1-2 docenas de conchas separadas para el consumo personal y el resto se entrega a los intermediarios (Mackenzie *et al.*, 2006).



**Figura 5: Modalidad de pesca de la especie**

**Fuente: Azabache ,2016**

### **3.3.7. Temporada de veda**

Mediante la Resolución Ministerial N° 014-2006-PRODUCE se decretó la veda reproductiva del recurso concha negra *Anadara tuberculosa* y concha huequera *Anadara similis*, a partir del 15 de Febrero hasta el 31 de Marzo de cada año, norma sustentada por la institución IMARPE “Situación actual de la pesquería del recurso concha negra *Anadara tuberculosa* (Sowerby) en la región de Tumbes (Imarpe, 2010).

### **3.3.8. Problemática de las conchas negras**

La población de la concha negra se encuentra severamente amenazada por la sobreexplotación, debido a la creciente demanda de la gastronomía, en especial en Ecuador y Perú. Además, el uso de los manglares para sacar madera, la conversión a otros usos y la contaminación del mar, impactan y disminuyen el hábitat de la especie. Según la legislación en Ecuador y Perú la talla mínima comercial es de 4,5 cm mientras que en Colombia la talla mínima es de 5 cm., Para alcanzar este tamaño la concha requiere entre 12 y 18 meses, período en el cual ya se habrá reproducido al menos 1 vez. Alrededor de 50.000.000 de conchas son extraídas mensualmente en los tres países, y se estima que un 70% no cumple con la talla mínima legal, por lo cual las poblaciones de esta especie no pueden recuperarse y mantenerse

### **3.3.9. Concha negra como alimento**

*Anadara tuberculosa*, bivalvo propio del ecosistema de manglar, es un recurso de gran importancia económica y constituye una fuente de proteína y sustento económico para las comunidades humanas asentadas cerca de su hábitat natural (Mendoza *et al.*, 2013).

El porcentaje de carne por peso es de 18,26%. La especie tiene importancia como fuente de proteínas ya que posee el 67,8% de esta (Lazarich, 2009).

Excelente proveedor de nutrientes como energía (70 Kcal), proteína (11,4 g), grasa total (0,5 g), colesterol (0mg), glúcidos (4), calcio (77 mg), hierro (9,5 mg) y vitamina E (1,3 ug), como se muestra en la Tabla 9 (FUNIBER, 2017).

Tabla 10: Composición nutricional

Nutrientes	Cantidad	Nutrientes	Cantidad	Nutrientes	Cantidad
Energía	70	Fibra (g)	0	Vitamina C (mg)	0
Proteína	11.40	Calcio (mg)	77	Vitamina D (µg)	-
Grasa Total (g)	0.50	Hierro (mg)	9.50	Vitamina E (mg)	1.30
Colesterol (mg)	-	Yodo (µg)	-	Vitam. B12 (µg)	-
Glúcidos	4	Vitamina A (mg)	0	Folato (µg)	0

Fuente: FUNIBER (2017)

## CAPÍTULO IV

### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1. Materiales:

A continuación se detalla los materiales de laboratorio utilizados en el presente trabajo de investigación de *Listeria monocytogenes*, que se muestran en la Figura 6:



Figura 6: Materiales de Laboratorio

Fuente: Propia 2017

#### 4.1.1. Materiales de vidrio:

- Matraces
- Balones
- Probetas
- Pipetas graduadas
- Tubos de ensayo
- Placas Petri

- Láminas excavadas

- Láminas planas

#### **4.1.2. Materiales de metal:**

- Balanza manual

- Mechero Bunsen

- Espátulas

- Asa de col

- Asa de siembra

- Pinza y tijera

- Tripode

- Gradilla

- Malla de asbesto

#### **4.1.3. Materiales de madera:**

- Maderas circulares

- Gradilla de madera

#### **4.1.4. Materiales de plástico:**

- Piseta

- Soporte de pipetas

- Placas Petri de plástico

**4.1.5. Materiales desechables:**

- Mascarilla
- Guantes de látex
- Algodón
- Ligas
- Papel filtro

**4.1.6. Equipos**

- Estufa
- Refrigeradora
- Microscopio óptico
- Autoclave

**4.1.7. Medios de cultivos:**

En las figuras 8, 9 y 10 se muestran medios de cultivo, viales para listeria y carbohidratos que sirven para el estudio de *Listeria monocytogenes.*, los cuales se citan a continuación.

- L-PALCAM Caldo de enriquecimiento selectivo para Listeria (Base) según Van Netten et al (Merck 1.10823.0500)
  - o Composición: (gr/litro) Peptona 23, extracto de levadura 5, litio cloruro 10, esculina 0.8, citrato de amonio y hierro III 0.5, D(-) manita 5, rojo fenol 0.08, soja lecitina 1, tween r80 2.

- PALCAM Agar selectivo para Listeria (Base) según Van Netten et al (Merck 1.11755-0500)
  - o Composición: (gr/litro) Peptona 23, extracto de levadura 5, almidón 1, cloruro sódico 5, agar-agar 13, D(-) manita 10, citrato de amonio y hierro III 0.5 , esculina 0.8, glucosa 0.5, cloruro lítico 15, rojo fenol 0.08
- Suplemento selectivo Oxford para Listeria (Merck 1.07006.0001)
  - o Composición: cicloheximida 200 mg, sulfato de colisinina 10 mg, acriflavina 2,5 mg, cefotetán 1 mg, fosfomicina 5 mg)
- Suplemento selectivo Fraser para Listeria (Merck 1.0399..0001)
  - o Composición: clorhidrato de acriflavina, 1 - etil - 1,4 - dihidro - 7 - metil - 4 - oxo - 1,8 - naftiridin - 3 - carboxilato de sodio
- Tritoptano de soya agar (OXOID CM0131)
- Peptone, Bacteriológica (MICROGEN BA2001)
- Agar Agar (SCHARLAU 07-490)
- Bacto™ Extracto de Levadura (BD 212750)
- Extracto de carne (OXOID LP0029)
- MR-VP Caldo de glucosa tamponada media - Caldo de fosfato de glucosa (HIMEDIA M070)
- Sacarosa (Merck K2180105 536)
- Lactosa (AR 56521)

- Glucosa(RP 148)
- D-xilosa (RP 5C412 31653)
- L(+)- Arabinosa (Merck 7498408)
- Glicerol (DIFCO 456646)
- D-Manitol (DIFCO 539940)
- Sangre humana



**Figura 7: Medios de Cultivos**

**Fuente: propia 2017**



**Figura 8: Viales para listeria**

**Fuente: Propia 2017**



**Figura 9: Carbohidratos**

**Fuente: Propia 2017**

#### 4.1.8. Reactivo e Indicadores:

En la figura 10 se muestran algunos reactivos indicadores utilizados en la investigación de *Listeria monocytogenes*, entre los cuales se citan:

- N.N Etano p. Fenilendiamina GR (LOBAL CHEMIE G-381308)
- Rojo Metil (RPE C.T 13020)
- Rojo Fenol (ICN 102609)
- Creatina (RP 440288)
- Kit para Tinción Gram
- Aceite de inmersión
- Alcohol etílico
- Peróxido de Hidrógeno al 10%
- Solución soda al 40%



Figura 10: Reactivos e indicadores

Fuente: Propia 2017

## 4.2. Métodos

La investigación de *Listeria monocytogenes* se realizó mediante la metodología aislamiento e identificación de USDA-FSIS (2002) y el Instituto de Salud Pública de Chile PRT-712.03-086 (2009).

### 4.2.1. Toma y homogenización de la muestra

Se recolectaron 105 muestras de conchas negras "*Anadara turberulosa*" en los Mercados de Abastos del distrito de Carabayllo (Lima-Perú), seleccionados aleatoriamente, de los cuales:

- 21 muestras son del Mercado Cumbre
- 21 muestras al Mercado Pollo
- 21 muestras al Mercado de Establo
- 21 muestras al Mercado Tungasuca
- 21 muestras al Mercado San Pedro

El muestreo fue aleatorio, comprando los especímenes frescos, por docenas, de los lugares antes mencionados. Las muestras fueron llevadas al laboratorio de Microbiología y Patobiología Acuática de la Facultad de Oceanografía, Pesquería, Ciencias alimentarias y Acuicultura de la Universidad Nacional Federico Villareal, en una caja de aislamiento térmico "tecnopor", refrigeradas, con bolsas de hielo, y fueron analizadas dentro de 2 horas de colectadas.

La investigación se llevó a cabo entre los meses de Abril y Junio del año 2017.

### 4.2.2. Análisis Microbiológico

Siguiendo la técnica estéril, los especímenes se pusieron en una fuente de metal limpia para sacar las unidades de muestra, abriendo las valvas y exhibiendo su contenido. Las porciones de estudio para la búsqueda de *Listeria monocytogenes* fueron de 25 g de material intervalvar (sólidos y fluidos) que se pusieron en un medio de enriquecimiento de un peso nueve veces mayor. El procedimiento que se siguió, como ya se mencionó, es el que recomienda la metodología de USDA-FSIS (2002).

#### 4.2.2.1. Enriquecimiento selectivo preliminar

Tomar una muestra representativa 25 gramos, tanto de la superficie como del interior en un recipiente contenido de 225 mL de medio de enriquecimiento (EB) Caldo de Enriquecimiento “L-PALCAM Caldo de enriquecimiento selectivo para Listeria (Base) según Van Netten et al (MERCK 1.10823.0500)”, que contiene un suplemento selectivo “Suplemento selectivo Fraser para Listeria”, luego se homogeniza e incuba las muestras entre 24 a 48 horas a 35°C. Las muestras pre- enriquecidas se muestra en la figura 11.

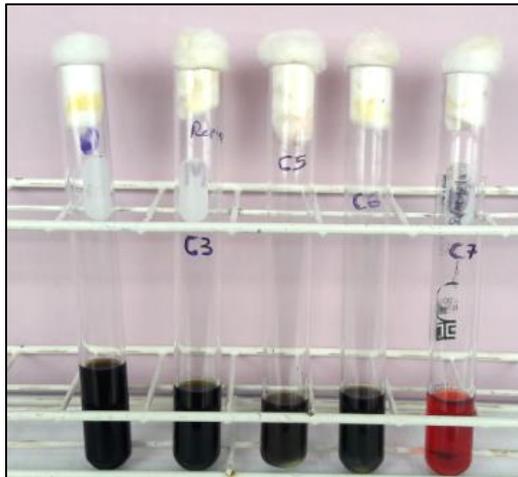


**Figura 11: Muestras pre- enriquecidas**

**Fuente: Propia 2017**

#### 4.2.2.2. Enriquecimiento

Tomar un inóculo de la muestra pre- enriquecida para luego introducirlo en un tubo de 10 mL de Caldo de Enriquecimiento “L-PALCAM Caldo de enriquecimiento selectivo para Listeria (Base) según Van Netten et al (MERCK 1.10823.0500)”, que contiene un suplemento selectivo “Suplemento selectivo Fraser para Listeria”, luego se homogeniza e incuba las muestras entre 24 horas. La figura 12 presenta las muestras enriquecidas.

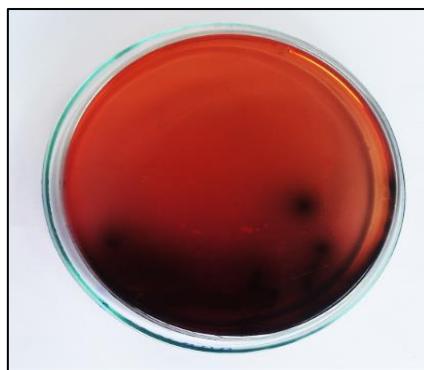


**Figura 12: Muestras enriquecidas**

**Fuente: Propia 2017**

#### **4.2.2.3. Aislamiento**

Después de haber incubado por 24 horas, sembrar solo las muestras que dieron positivo (medio de coloración negra) en "PALCAM Agar selectivo para Listeria (Base) según Van Netten et al (Merck 1.11755-0500)", que contiene un suplemento selectivo "Suplemento selectivo Oxford para Listeria" luego se incubó a 35°C por 2 días. Luego, observar las colonias presuntivas, crecidas en el medio, se volvieron a sembrar en el mismo medio selectivo para su mejor observación macroscópica. La figura 13 Muestra en Agar Palcam- Listeria con colonias típicas.



**Figura 13: Muestra en Agar Palcam- Listeria**

**Fuente: Propia 2017**

#### 4.2.2.4. Conservación de cepa

Las colonias presuntivas se siembran en agar TSA-YE en un periodo entre 24 a-48 horas a 35°C. Luego de este tiempo, llevar a refrigeración para luego proceder a realizar su análisis bioquímico. Las muestras en TSA-YE se presentan en la figura 14.



Figura 14: Muestra en TSA-YE

Fuente: Propia 2017

#### 4.2.2.5. Caracterización morfológica y enzimática

##### - Tinción Gram

Determinar mediante la prueba de tinción gram, cabe decir el género *Listerias* spp son bacilos cortos gram positivos; sin embargo, algunos cultivos pueden presentar una morfología diferente debido al periodo de incubación y algunas pueden observarse en forma de cocos (Adaptado del Instituto de Salud Pública de Chile, 2009). Se muestra el Gram (+) en la figura 15.



Figura 15: Gram (+)

Fuente: Propia 2017

- **Prueba de movilidad**

Sembrar en TSA la cepa presuntiva e incubó a temperatura ambiente 25°C por 2 días, luego se extrajo un inóculo y examino la movilidad formando una suspensión de agua en donde se emulsiona con el agua para luego apreciar la movilidad en el microscopio con objeto de inmersión de fase contraste (Adaptado del Instituto de Salud Pública de Chile, 2009).

- **Prueba de catalasa:**

En un lámina plana estéril agregar 1 gota de peróxido de hidrógeno al 10% y suspender el inóculo con aplicador de asa de col; luego observar la reacción, si es positivo se observa la formación de espuma; por el contrario si no hay ninguna reacción se observa transparente (Adaptado de Mossel *et al.*, 1967)

#### 4.2.2.6. Caracterización Bioquímicas

- **Prueba de Oxidasa: (Según Fernando Quevedo)**

En una placa Petri estéril poner un papel filtro luego agregar una gota de  $\alpha$ -naftol y 1 gota de N.N Dimethyl p. Phenylenediamine por último tomar un inóculo del TSA-YE 6% y emulsionar en la mezcla de los reactivos puestos en primera instancia; luego se observa la reacción, si es positivo se observa una coloración azul oscuro; por el contrario si no hay ninguna reacción se observa color vino (Adaptado de McFaddin, 1976).

- **Fermentación de Carbohidratos:**

De la conservación de cepas presuntivas de *Listeria monocytogenes* puras y aisladas en placa de agar Soya tripticasa con extracto de levadura 6% a 30° C por 24 a 48 h, examinar sus características y realizar las pruebas siguientes:

**Para pruebas negativas:**

Inocular en base caldo de púrpura de bromocresol con 0,5 % de carbohidrato, luego incubar a 35°C por un periodo de 48 horas (Adaptado de McFaddin, 1976)

Carbohidratos:

- D-Xilosa
- D- Manitol
- L(+)- Arabinosa

**Para pruebas positivas:**

Inocular en base semisólido de Agar rojo fenol con 0.5% de carbohidrato, luego incubar a 35°C por un periodo de 48 horas (Adaptado de Faddin, 1976)

Carbohidratos:

- Glucosa
- Sacarosa
- Lactosa
- Glicerol

- **Reducción de Nitratos:**

Inocular en caldo nitrato e incubó por un periodo entre 2 a 5 días a 35°C, luego se adiciona 0,2 mL del reactivo de  $\alpha$ -naftilamina y del ácido sulfanílico., después de 30 segundos al observar desarrollo de color roja dando un resultado negativo (Adaptado de McFaddin, 1976)

- **Voges Proskauer**

Inocular en un medio de RM – VP y dejar a temperatura ambiente por un periodo entre 2 a 7 días, luego se adiciona 1 mL de cultivo añada 12 gotas ( $\pm$  0,6 mL) de  $\alpha$ -naftol al 5% en etanol y 4 gotas ( $\pm$  0,2 mL) de KOH al 40%, agite y deje reposar por 5 a 10 minutos, la aparición de un color rosado constituye una reacción positiva

indicadora de la presencia de acetoína, producto de la fermentación de la glucosa (Adaptado de McFaddin, 1976)

- **Rojo Metilo**

Inocular en un medio de RM – VP y dejar a temperatura ambiente por un periodo entre 2 a 7 días, luego se adiciona 5 gotas de solución indicadora de Rojo de Metilo, la aparición de una coloración roja, indicadora de la presencia de ácidos provenientes de la fermentación de la glucosa, constituye un resultado positivo, una coloración amarilla constituye una reacción negativa (Adaptado de McFaddin, 1976)

#### 4.2.2.7. Caracterización hemolítica

- **Prueba Hemolisis**

Preparar placas de agar de cordero al 5%, que contengan aproximadamente 15 mL de agar, lo ideal es obtener una profundidad inferior a 5 mm, esto se puede lograr efectuando superposición del agar en 1-2 mm. Utilizar la placa con agar sangre bien seca (comprobar que están libre de humedad antes de usar). Siempre considerar controles positivos: *Listeria monocytogenes* y *Listeria ivanovii* y control negativo: *Listeria innocua*. Incubar por 24-48 h (Adaptado de McFaddin, 1976).

- **Prueba CAMP**

Realizar la prueba inocular por estría una cepa de *S. aureus*  $\beta$ - hemolítico y en vertical la cepa presuntiva de *Listeria monocytogenes* en un aplaca de agar sangre de humana e incubar a 35° C por 24- 48 h. (Adaptado de McFaddin, 1976).

A continuación en la figura 17 se muestra el diagrama de flujo para la identificación del genero *Listeria*.

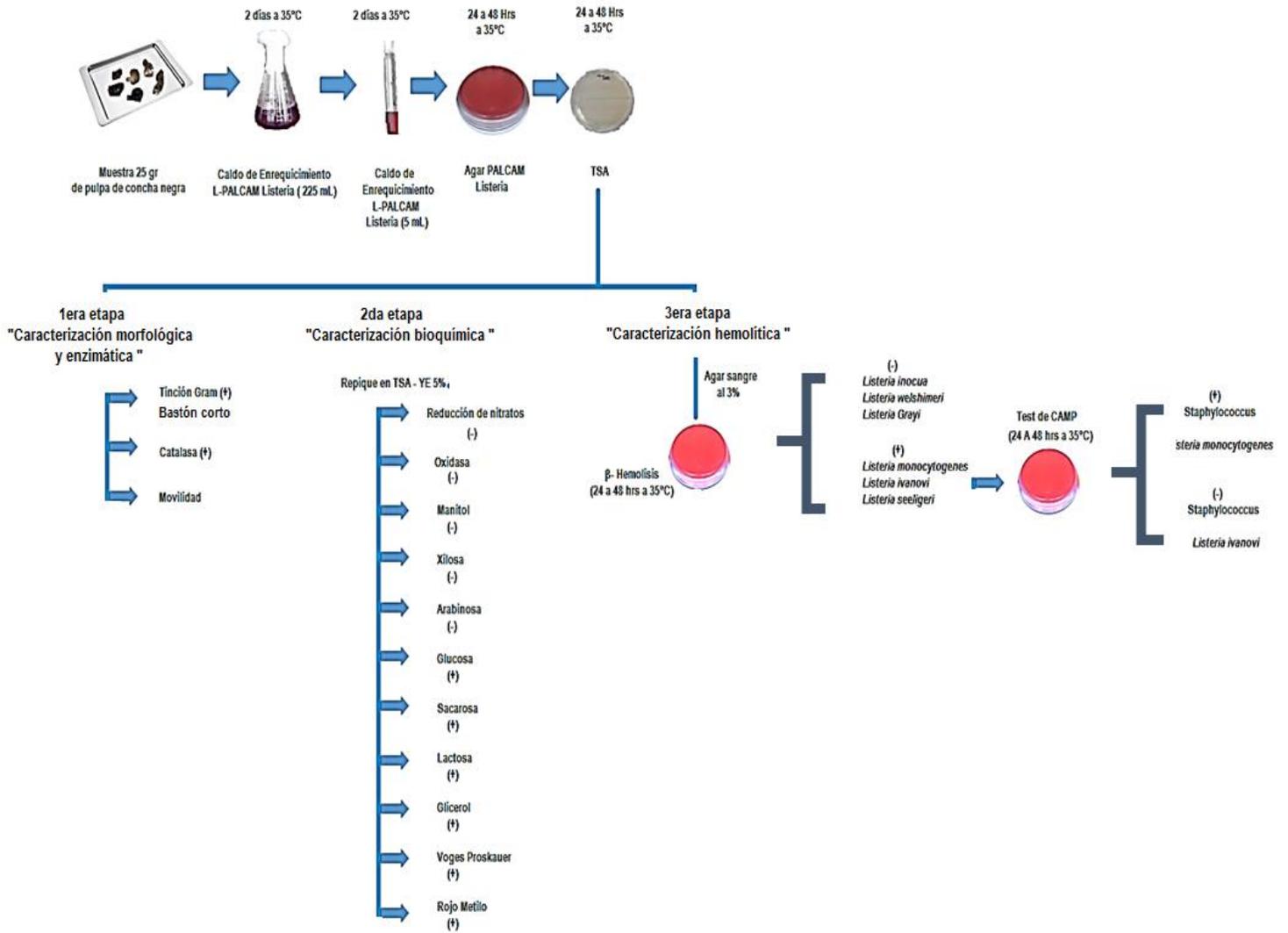


Figura 16: Diagrama de flujo para la identificación del genero *Listeria*

Fuente: Propia 2017

## CAPÍTULO V

### 5. Resultados

De las muestras procedentes de los 5 Mercados de Abastos del distrito de Carabaylo, se tomó 21 muestras de cada mercado, logrando aislar 3 muestras de *Listeria monocytogenes* en conchas negras, 2 para *Listeria innocua* y 2 *Micrococcus* como se muestra en la tabla 11.

De las 21 muestras escogidas aleatoriamente del Mercado Cumbre ninguno dio como resultado positivo, pero se determinó 2 microbios denominado *Micrococcus*.

De las 21 muestras escogidas aleatoriamente del Mercado Pollo, 01 muestra resulto positiva para *Listeria monocytogenes* representando 4,76%, en cambio 20 muestras resultaron negativas.

De las 21 muestras escogidas aleatoriamente del Mercado Establo 01 muestra resulto positiva para *Listeria monocytogenes* representando el 4,76%, mientras que 20 muestras resultaron negativas, encontrando dentro de las negativas 01 especie del genero *Listeria* denominada *Listeria innocua*.

De las 21 muestras escogidas aleatoriamente del Mercado Tungasuca, 01 muestra resulto positiva para *Listeria monocytogenes* representando el 4,76%, mientras las demás fueron negativas.

De las 21 muestras escogidas aleatoriamente del Mercado San Pedro, ninguno dio como resultado positivo, además, se determinó otro microbio de nombre *Listeria innocua*.

De las 105 muestras que proceden de los 05 mercados muestreados aleatoriamente del distrito de Carabaylo, 3 resultaron positivas para *Listeria monocytogenes* representando 2,86 %.

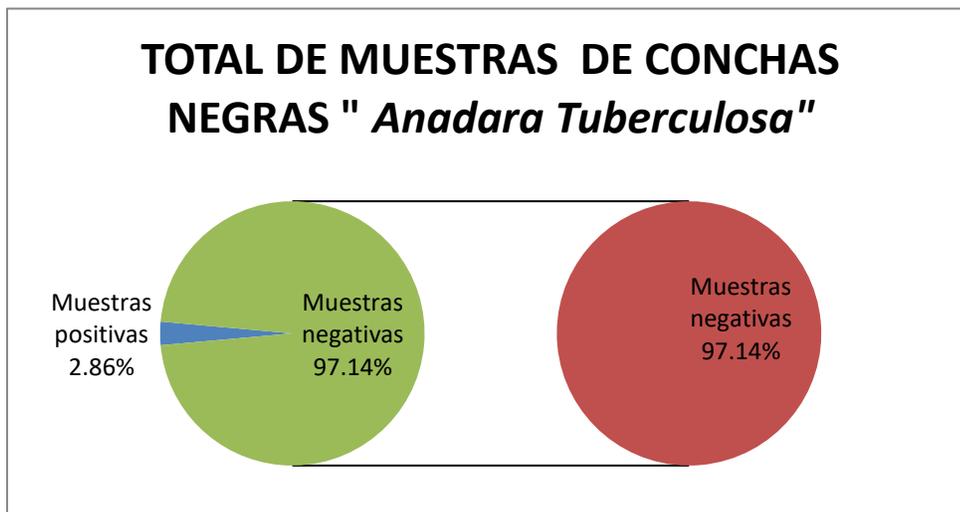


Figura 17: Número total de muestras de conchas negras "*Anadara tuberculosa*" que dieron positivo al aislamiento de *listeria monocytogenes*.

Fuente: Propia 2017

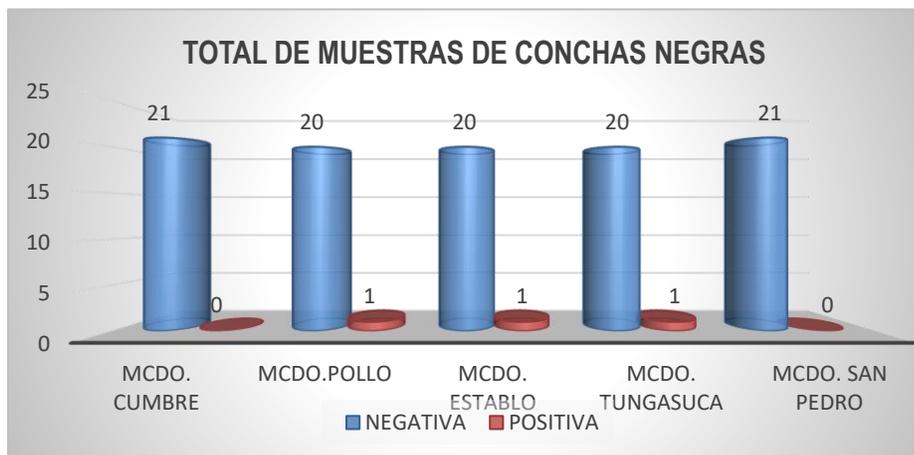


Figura 18: Comparación de resultados positivos – negativos para *listeria monocytogenes* conchas negras "*Anadara tuberculosa*".

Fuente: Propia 2017

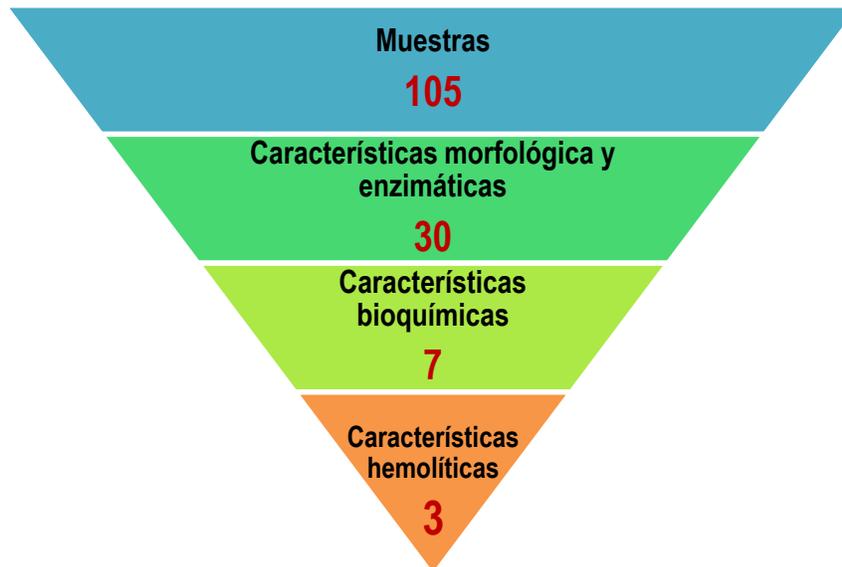


Figura 19: Resultados de las 3 etapas de caracterización

Fuente: Propia 2017

Tabla 11: Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en muestras “conchas negras” según el lugar de procedencia

N°	MERCADO	Características morfológicas y enzimáticas			Características bioquímicas											Características hemolíticas		Identificación
		TINCIÓN GRAM	MOV (30°C)	CAT	OXI	MAN	XIL	ARA	GLU	SAC	LAC	GLY	VP	RM	R-NOX	HEM	PRUEBA CAMP	
3	CUMBRE	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	α	+	<i>Micrococcus</i>
13		+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	α	+	<i>Micrococcus</i>
24	POLLO	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	β	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
44	ESTABLO	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	δ	-	<i>Listeria innocua</i>
48		+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	β	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
68	TUNGASUCA	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	β	+	<i>Listeria monocytogenes</i>
93	SAN PEDRO	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	δ	-	<i>Listeria innocua</i>

Fuente: Propia 2017

**Nota:** Del total de 105 muestras tomadas aleatoriamente de los mercados Cumbre, Pollo, Establo, Tungasuca, y San Pedro, solo las muestras C-24 (Mcd. Pollo), C-48 (Mcd. Establo) y C-68 (Mcd. Tungasuca) resultaron ser *Listeria monocytogenes*.

MERCADO DE ABASTECIMIENTO DE PROCEDENCIA										
Especie de listeria	Mercado Cumbre		Mercado Pollo		Mercado Establo		Mercado Tungasuca		Mercado San Pedro	
	N° de muestra	%	N° de muestra	%	N° de muestra	%	N° de muestra	%	N° de muestra	%
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	0	1	4,76	1	4,76	1	4,76	0	0
<i>Listeria innocua</i>	0	0	0	0	1	4,76	0	0	1	4,76
Ninguna	21	100	20	95,24	19	90,48	20	95,24	20	95,24
<b>TOTAL</b>	<b>21</b>	<b>100</b>	<b>21</b>	<b>100</b>	<b>21</b>	<b>100</b>	<b>21</b>	<b>100</b>	<b>21</b>	<b>100</b>

Tabla 12: Resultados Finales

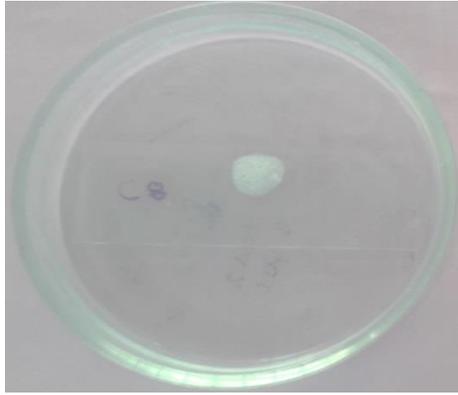
Fuente: Propia 2017

Figura 20: Colonias de *Listeria monocytogenes* en AGAR PALCAM

Fuente: Propia 2017

Después de 24 horas de incubación en la estufa a 35°C , las colonias son de color azuladas verdosas , redondas de 1mm de diámetro con halo negro. Después de 48

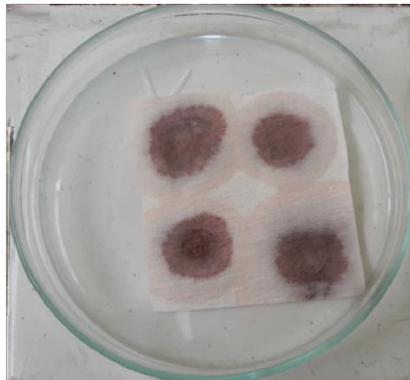
horas, las colonias son viejas y se observan con mayor diámetro) y un halo negro formando más pronunciado más oscurecido.



**Figura 21: Prueba Bioquímica “CATALASA (+)”**

**Fuente: Propia 2017**

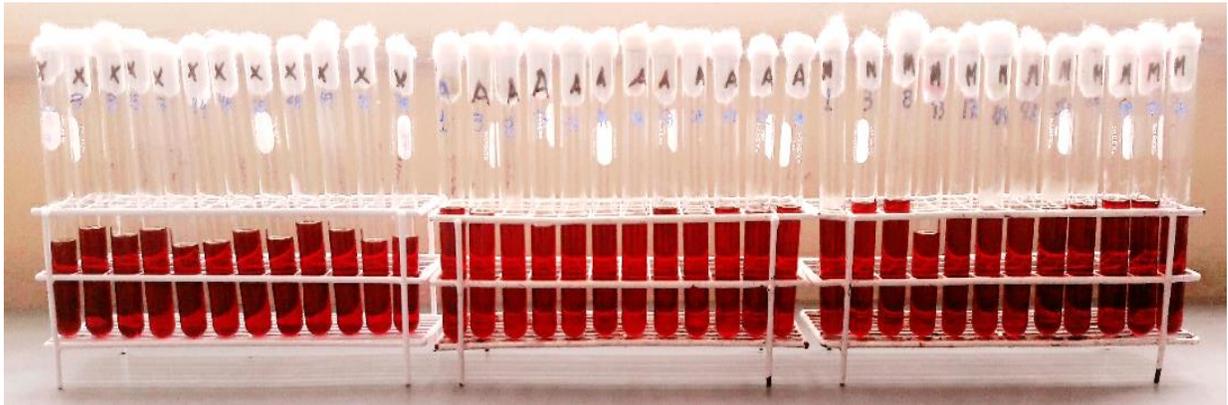
En el instante de suspender el inóculo en la gota de peróxido de hidrógeno al 10%, se observa la formación de burbujas, esto es un indicador positivo.



**Figura 22: Prueba Bioquímica “OXIDASA (+)”**

**Fuente: Propia 2017**

En el instante de emulsionar el inóculo en la combinación de gotas de  $\alpha$ -naftol y N.N Dimethyl p. Phenylenediamine, se observa la coloración roja, esto es un indicador negativo.



**Figura 23: Prueba Bioquímica “Fermentación de carbohidratos”**

**Fuente: Propia 2017**

Después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente 35°C en base caldo de púrpura de bromocresol con 0,5 % de carbohidrato (Xilosa, Arabinosa, y Manitol), se observa una coloración roja indicador de reacción negativa.



**Fuente: Propia 2017**

Después de 48 horas de incubación a temperatura ambiente 35°C base semisólido de Agar rojo fenol con 0.5% de carbohidrato (Sacarosa, Glucosa, Lactosa y Glicerol), se observa una coloración amarilla indicador de reacción positiva.

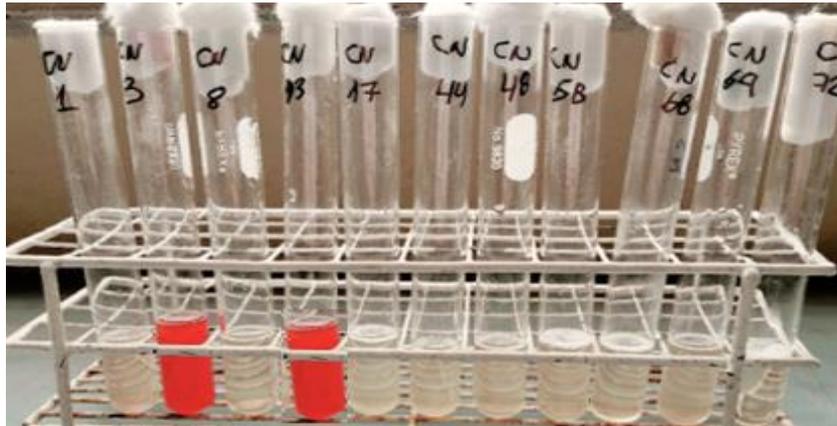


Figura 24: Prueba Bioquímica “Reducción de Nitratos a nitritos”

Fuente: Propia 2017

Después de 5 días de incubación a temperatura ambiente 25°C en caldo nitrato, se le agregó 1 gota de reactivo de GRIES, luego se observa una coloración transparente indicador negativo y 1 tubo de color rojo indicador positivo.

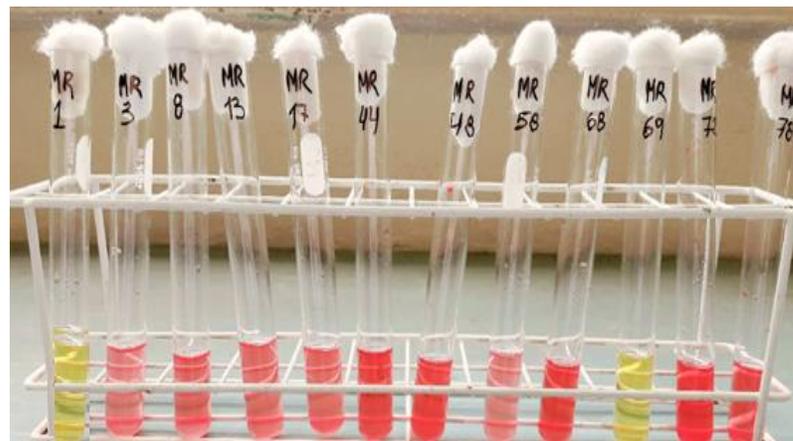


Figura 25: Prueba Bioquímica “Rojo Metilo”

Fuente: Propia 2017

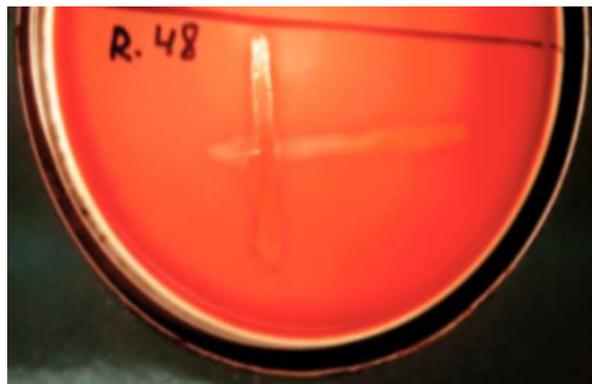
Después de 7 días de incubación a temperatura ambiente 25°C, se observa 10 tubos dieron coloración roja indicador positivo; por otro lado, también se observa 2 tubos de coloración amarilla indicador de prueba negativa.



**Figura 26: Prueba Bioquímica “Voges Proskauer”**

**Fuente : Propia 2017**

Después de 7 días de incubación a temperatura ambiente 25°C, se observa 12 tubos dieron coloración roja indicador positivo.



**Figura 27: Prueba de Hemolisis**

**Fuente : Propia 2017**

Se observa en la muestra C-48 la hemolisis pronunciada de la *Listeria monocytogenes*, y en vertical el *Staphylococcus aureus*.

## CAPÍTULO VI

### 6. Discusión

La toxiinfección alimentaria “Listeriosis” por alimentos cárnicos, leche y sus derivados, pescado ahumado y crudo, mariscos (conchas negras), hortalizas, alimentos procesados son un riesgo para la salud.

La toxiinfección alimentarias “Listeriosis” cuyo agente es la especie *Listeria monocytogenes*, es poco común pero de suma gravedad, es una de las enfermedades alimentarias de mayor riesgo de salud, debido al impacto social y económico que tiene por el grado de severidad del patógeno

En el trabajo “Cuantificación de *Listeria monocytogenes* en choritos (*Mytilus chilensis*) vivos y cocidos congelados para exportación” de González Pérez Pía Loreto en 2011. Los resultados muestran que la *L. monocytogenes* en los choritos vivos y cocidos congelados examinados representan un bajo riesgo para la población consumidora, lo mencionado tiene validez, pero siempre se debe considerar la existencia de una población sensible a la cual le puede causar una enfermedad letal como la listeriosis.

Por otro lado, Otero Carballera Andrés, Cepeda Sáez Alberto, Dominguez Rodriguez Lucas, Rodriguez Ferri Elpías, Zuzera Cosano Gonzalo, Alonso Andicoberry Cristina en el 2009, realizaron una investigación sobre la evaluación del riesgo asociado a la presencia de listeria monocytogenes en pescado fresco o congelado, lo que tuvo como resultado, la mayor parte del pescado fresco o congelado ha de estar libre de *Listeria monocytogenes*, no se puede descartar la presencia de una ligera contaminación con esta bacteria si el pescado procede de aguas contaminadas, además, la presencia de *L. monocytogenes* en pescado y productos de la pesca puede tener graves consecuencias otros productos económicas, lo mencionado refuerza la

necesidad de Implementar programas preventivo para definir el marco legal que permita garantizar la inocuidad alimentaria y hacer obligatorio el reporte de brotes.

Además, en el trabajo “Evaluación de la calidad microbiológica de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) depurado” de López Mendoza María Carmen, Alonso Sousa Santiago, Alapont Gutiérrez Cristina en el 2016. El resultado obtenido fue que el mejillón mediterráneo, al igual que los moluscos bivalvos, se alimentan por filtración, por lo que concentra los virus y bacterias de las aguas en las que hábitat. Esto puede suponer un riesgo alimentario para los consumidores. Lo mencionado refuerza la idea de que los moluscos bivalvos se alimentan por filtración concentrando bacterias, virus y residuos químicos en sus tejidos; por lo que hacen que sean susceptibles a contaminarse.

En el Perú, la investigación de aislamiento e identificación de *Listeria sp* en productos hidrobiológicos frescos y procesados de nuestro litoral, de las 50 muestras analizadas 32 muestras determinaron la incidencia del género *Listeria sp* y 9 muestras como *Listeria monocytogenes*, encontrando mayor incidencia de *Listeria sp* en moluscos seguido en peces y crustáceos. El análisis microbiológico se realizó de acuerdo a la metodología recomendada en el FDA, se logró aislar 9 muestras con el microorganismo a investigar además se complementó con pruebas bioquímicas para identificar otras especies (Ramos, 1991), esta idea va acorde a la investigación ya que para la identificación de la *Listeria monocytogenes* se tuvo que realizar caracterización bioquímicas y hemolíticas para determinar la especie.

Además, en el trabajo de Fuchs, R. y Sirvas en 1991, de las 32 muestras de cebiche se determinó la incidencia de la especie *Listeria monocytogenes*, de las cuales el 75% dio resultado positivo para el género *Listeria sp*, y de este el 12,5% fue positivo para *Listeria monocytogenes*.

Los resultados de la presente tesis de investigación, de las 105 muestras de conchas negras resultó el 2,86 % positivo para la prevalencia de la especie *Listeria monocytogenes*. La

concentración de sal en los alimentos es un factor importante para determinar la presencia de microorganismos como *L. monocytogenes*.

Las conchas negras es un alimento que tiene gran aportación nutricional, rico en proteínas y vitaminas y gran proveedor de minerales se consume crudo, salvo en algunas comidas en donde se aplica un proceso térmico, además, es frecuente que toda la población lo consuma en esas condiciones. Aún no se conoce la dosis de infección de la toxiinfección alimentaria "Listeriosis" para el humano; por lo que es esencial destacar, que si *L. monocytogenes* se encuentra en el alimento, aunque se desconozca la dosis de infección, representa un riesgo para la salud, especialmente para personas que se encuentren gestantes, con sistema inmunológico bajo, inmunodeprimidos, recién nacidos y personas mayores, ya que es enfermedad silenciosa con una gran tasa de mortalidad.

En los últimos años han despertado un mayor interés debido a las epidemias ocurridas en distintos países asociados al consumo de determinados alimentos. De ahí la importancia de la correcta identificación y notificación de los casos con vistas a prevenir la aparición de brotes epidémicos. (Remacha, 2002), esta premisa es de suma importancia para la presente tesis ya que se debe notificar la presencia del patógeno en alimento encontrado.

En cuanto a las barreras políticas promovidas por distintos países sobre los límites de tolerancia para *L. monocytogenes* en los alimentos, existen ambigüedades, pero según recoge FDA, 2012, actualmente se desconoce la ID 50 exacta de *L. monocytogenes* pero si se sabe que para poblaciones susceptibles es de  $10^3$  UFC/g ; por lo que se recomienda que para aquellos alimentos que estimulen el crecimiento del microorganismo, se aplique los controles correspondientes, particularmente en los alimentos crudos , tal como las conchas negras. Otra estrategia, es que se realicen cambios en el ambiente microbiológico mediante tratamiento térmico, se debe realizar para impedir la proliferación del microorganismo en los alimentos crudos.

Los productos tales como L-PALCAM Caldo de enriquecimiento selectivo para *Listeria* (Base) y PALCAM Agar selectivo para *Listeria* (Base) de la empresa MERCK son de carácter confiable para su detección.

Por tanto, los resultados hallados en la presente investigación de materia son de carácter inédito; por lo que puede ser utilizado en otras investigaciones, además, abrirá nuevos caminos para estudios sustantivos que presenten situaciones similares a la que aquí se plantea, sirviendo como marco referencial.

## CAPÍTULO VII

### 7. Conclusiones

La prevalencia de *Listeria monocytogenes* en las conchas negras "*Anadara tuberculosa*" procedentes de los Mercados de Abastos del distrito de Carabayllo es de 2,86%.

Las cepas de *Listeria monocytogenes* se identificaron mediante las pruebas de capacidad hemolítica para su confirmación.

En el Mercado Pollo el 4,76% de las muestras, presento *Listeria monocytogenes*, en el Mercado Establo el 4,76% y en el Mercado Tungasuca el 4,76%.

En el Mercado Cumbre y San Pedro no presento *Listeria monocytogenes*; sin embargo, se evidencio la presencia de *Micrococcus* y *Listeria innocua*

Los resultados indican que las conchas negras "*Anadara tuberculosa*" son vehículos de transmisión de *Listeria monocytogenes*, convirtiéndose en alimentos de riesgo bajo; que deben ser vigilados y controlados por la autoridad competente.

La técnica aplicada por la USDA-FIS y el Instituto de Salud Pública de Chile PRT-712.03-086 es un método de confiable para identificar la *Listeria monocytogenes*.

## CAPÍTULO VIII

### 8. Recomendaciones

La forma de impedir que los alimentos contaminados con esta bacteria supongan un peligro para el consumidor consiste en aplicarles algún tipo de tratamiento que, bien destruyan a *L. monocytogenes*, o bien impidan su crecimiento, sin que se produzca la alteración de las características nutritivas y organolépticas del alimento.

El único tratamiento eficaz al que se puede someter un alimento contaminado con *L. monocytogenes* y que permite asegurar la total destrucción de *L. monocytogenes* presentes es la aplicación de altas temperaturas.

Implementar programas preventivos, definir el marco legal que permita garantizar la inocuidad alimentaria y hacer obligatorio el reporte de brotes o casos de listeriosis.

Implementar de programas de buenas prácticas higiénicas y recalcar la importancia de hacer estudios que evalúen el riesgo microbiológico y las características patogénicas de las cepas aisladas de alimentos.

## CAPITULO IX

### 9. Referencias bibliográficas

**Anadara tuberculosa.** (s.f.). En *Wikipedia*. Recuperado el 31 de agosto de 2017 de [https://es.wikipedia.org/wiki/Anadara\\_tuberculosa](https://es.wikipedia.org/wiki/Anadara_tuberculosa)

**Aureli P, G C Fioruci, D Caroli, G Marchiaro, O Novara, L Leone, and S Salmaso. (2000).** An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med*, 342, 1236–1241.

**Azabache Cobeña José Manuel Felipe. (2015).** *Cadena productiva de Anadara tuberculosa (sowerby 1833) extraída en el santuario nacional los manglares de tumbes, 2015.* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes, Perú.

**Baines D, Sea R. (1990).** Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings. En **Bahk J, Yousef, A.E, and Marth, E.M. (Ed), Behavior of Listeria monocytogenes in the presence of selected spices (pp. 66-69).** Cambridge, USA: Woodhead publishing limited

**Benadof, Dona. (2008).** *Listeria monocytogenes. Revista chilena de infectología, 25(5), 350.* <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182008000500005>

**Betancourt Oriana, Villagrán Karen, Muñoz Fredy, Gutiérrez Eladio, Mayorga Mauricio, & Melgarejo Patricia. (5 de Enero del 2010).** Serotipos de *Listeria Monocytogenes* aislados de alimentos producidos en la provincia de Cautín, Chile. *Revista Científica, 20(5), 529-536*

**Blanco Gutiérrez M. del Mar. (1994).** *Recuperación de Listeria monocytogenes dañada subletalmente por efecto de la congelación.* (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

**Blenden D C, E H Kampelmacher, and M J Torres-Anjel. (1987).** Listeriosis. *J Am Vet Med Assoc.* 191, 1546–1551.

**Brackett R. (1988).** Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Tech*, 42 (4), 162-164.

**Callejo Raquel, Prieto Mónica, Martínez Claudia, Aguerre Lorena, Rocca Florencia y Martínez Gisela. (2008).** Manual de procedimientos aislamiento, identificación, caracterización de *Listeria monocytogenes*. Recuperado de [http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual\\_Listeria\\_monocytogenes\\_2008.pdf](http://bvs.panalimentos.org/local/File/Manual_Listeria_monocytogenes_2008.pdf)

**Cano Otalvaro Jennee Lorena. (2011).** *Caracterización morfométrica de Anadara tuberculosa y A. similis en la costa pacífica Colombiana.* (Tesis de pregrado). Universidad del valle, Santiago de Cali, Colombia.

**C.W. Donnelly, R.E. Brackett, S. Doores, W.H. Lee, and J. Lovett (1992).** *Listeria*. Recuperado de <http://www.https://es.scribd.com/doc/175277567/Microbiologia-Bacteriological-Analytical-Manual-FDA-2001>

**Castañeda-Ruelas, Gloria, Eslava-Campos, Carlos, Castro-del Campo, Nohelia, León-Félix, Josefina, & Chaidez-Quiroz, Cristóbal. (28 de Julio del 2014).** *Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica.* *Salud Pública de México*, 56(6), 654-659

**Centurión Puma Mabel Susana, Takajara Santander Milagros Elizabeth. (2004).** *Determinación de la incidencia de Listeria monocytogenes en pollos frescos y verduras frescas obtenidos en mercados y centros de abastecimiento de Lima Metropolitana.* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú

**Chin James. (2001).** *El control de las enfermedades transmisibles.* Washington, USA: American Public Health Association

**Dongyou Liu. (2006).** Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen, *Journal of Medical Microbiology*, 55, 645–659.

**Elika. (2006).** *Listeria monocytogenes*. Recuperado de <http://www.elika.net/datos/riesgos/Archivo21/Listeria.pdf>

**Elika. (2013).** *Listeria monocytogenes*. Recuperado de [http://www.elika.eus/datos/pdfs\\_agrupados/Documento85/Copia%20de%204.Listeria.pdf](http://www.elika.eus/datos/pdfs_agrupados/Documento85/Copia%20de%204.Listeria.pdf)

**FAO/OMS. (2004).** *Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo*. Recuperado de [ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4\\_es.pdf](ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4_es.pdf)

**Farber J M, P I Peterkin, A O Carter, P V Varughese, F E Ashton, and E P Ewan. (1991).** Neonatal listeriosis due to cross-infection confirmed by isoenzyme typing and DNA fingerprinting. *The Journal of Infectious Diseases*, 163(4), 927–928.

**Farber JM, Coates E, Daley E. (1992).** Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*, *LettAppMicrobiol.*;15(3), 103-105.

**FDA-CFSAN USDA-FSIS. (2001).** *Structure and initial data survey for the risk assessment of the public health impact of foodborne Listeria monocytogenes*. Recuperado de <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/listrisk.html>

**Fischer w., Krupp F., Schneider W., Sommer C., Carpenter K.E., Niem V.H.(1995).** *Guía FAO para la Identificación de especies para los fines de pesca*. Roma, Italia: FAO

**FSIS. (2005).** *Procedure for the Use of Listeria monocytogenes BAX (73) Screening Test*. Recuperado de [http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological\\_Lab\\_Guidebook/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/Science/Microbiological_Lab_Guidebook/index.asp)

**Fuchs RS y Sirvas S. (1991).** *Incidence of Listeria monocytogenes in an acidified fish product, ceviche.* doi: 10.1111/j.1472-765X.1991.tb00512.x

**Fuchs, R.S. and Surendran, P.K. (27 de Abril del 1989).** *Incidence of Listeria in tropical fish and fishery products.* *Letters in Applied Microbiology*, 9: 49–51.

**González Pérez Pía Loreto. (2011).** Cuantificación de *Listeria monocytogenes* en choritos (*Mytilus chilensis*) vivos y cocidos congelados para exportación, provenientes de Chiloé, x región de los lagos, Chile. (Tesis de pregrado). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

**García Domínguez Federico A., De Haro Hernández Alejandro, García Cuellar Ángel, Villalejo Fuerte Marcial y Rodríguez Astudillo Sonia. (3 de abril del 2008).** Ciclo reproductivo de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) (Arcidae) en Bahía Magdalena, México. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 43(1) ,143-152

**ICMSF. (1998).** *Microbiología de los alimentos característicos de los patógenos microbianos.* Zaragoza, España: ACRIBIA S.A.

**IMARPE. (2010).** *Concha negra.* Recuperado de [http://www.imarpe.gob.pe/tumbes/especies\\_comerciales/invertebrados/concha\\_negra.pdf](http://www.imarpe.gob.pe/tumbes/especies_comerciales/invertebrados/concha_negra.pdf)

**Instituto de Salud Pública de Chile. (2009).** *Procedimiento para identificación bioquímica de cepas de listeria monocytogenes aisladas en alimentos y ambiente.* Recuperado de [http://www.ispch.cl/lab\\_amb/met\\_analitico/2\\_6\\_09/microbiologia/PRT-086.pdf](http://www.ispch.cl/lab_amb/met_analitico/2_6_09/microbiologia/PRT-086.pdf)

**Kamp H D, Higgins D E. (2009).** *Transcriptional and posttranscriptional regulation of the GmaR antirepressor governs temperature-dependent control of flagellar motility in Listeria monocytogenes.* doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06874.x

**Klatt E C, Z Pavlova, A J Teberg, and M L Yonekura. (1986).** Epidemic neonatal listeriosis at autopsy. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177\(86\)80572-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0046-8177(86)80572-X)

**Larraín De la C. Demetrio y Carvajal Jorge. (1 de octubre del 2008).** Los aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de listeria monocytogenes a través de la barrera placentaria. *Boletín escuela de medicina U.C., Pontificia Universidad Católica de Chile*, 33(1), 20-30

**Lazarich Gener, R. (2009).** *Estudio de mercado de la concha negra (Anadara similis y Anadara tuberculosa) en Nicaragua: Comercialización con garantía de inocuidad.* Centro de Investigaciones de Ecosistemas Acuáticos (CIDEA-UCA).

**Listeria monocytogenes. (s.f.).** En *Wikipedia*. Recuperado el 20 de marzo de 2017 de [https://es.wikipedia.org/wiki/Listeria\\_monocytogenes](https://es.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes)

**Lorber B. (1996).** Listeriosis. *Clin Infect Dis*, 24(1), 1–11.

**López Mendoza María Carmen, Alonso Sousa Santiago, Alapont Gutiérrez Cristina. (6 de Noviembre del 2016).** Evaluación de la calidad microbiológica de mejillón (*Mytilus galloprovincialis*) depurado. *Revista científica*, 26(6), 351-358.

**MacFaddin Jean F. (1976).** *Biochemical tests for identification of medical bacteria.* Baltimore, United States of America: Waverly, Press Inc.

**MacKenzie, C.L. y Buesa, R.J. (2006). (46)** *Vida de los Pescadores Costeros del Pacífico desde México a Perú y su Dependencia de la Recolecta de Conchas (Anadara spp.), Almejas (Polymesoda spp.), Ostiones (Crassostrea spp., Ostreola spp.), Camarones (Penaeus spp.), Cangrejos (Callinectes spp.), y la Pesca de Peces de Escama en Los Manglares.* Recuperado de <https://www.nefsc.noaa.gov/publications/crd/crd0607/crd0607.pdf>

**Mclauchlin James and Rees Catherine. (2009).** *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology- Genus I. Listeria* Pirie 1940, 38(1), 244-256

**Moreno Roldán Elena, Espigares Rodríguez Elena, Navarro Vicente Carmen, Fernández-Crehuet Navajas Milagros, Moreno Abril Obdulia. (2011).** Contaminación microbiana de moluscos bivalvos utilizados para el consumo humano. Doi: 10.1111 / j.1745-4565.2010.00294.x

**OIE. (2008).** *Listeria monocytogenes*. Recuperado de [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.09.07.%20Listeria%20monocytogenes.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.07.%20Listeria%20monocytogenes.pdf)

**Otero Carballera Andrés, Cepeda Sáez Alberto, Domínguez Rodríguez Lucas, Rodríguez Ferri Elías, Zuzera Cosano Gonzalo, Alonso Andicoberry Cristina. (13 de mayo del 2009).** Informe del comité científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a la evaluación del riesgo asociado a la presencia de *Listeria monocytogenes* en pescado fresco o congelado. Revista científica, 10(1), 27-40

**Marcenac Fernando M. L.(1988).** *Bacteriología de la Listeriosis*. Recuperado de <http://hdl.handle.net/10915/29314>

**Medrano Mayra Viviana / Restrepo Silvia / Vanegas María Consuelo (3 de Setiembre del 2006).** Tipificación molecular de listeria monocytogenes aisladas de muestras clínicas y alimentos. *Biomédica*. 26(3), 442-450

**Mendoza N Oscar., Alvitres C. Víctor. (26 de Enero del 2013).** Crecimiento y supervivencia de *Anadara tuberculosa* (Sowerby, 1833) a tres densidades. *Revista de Investigación Científica Universidad Nacional de Tumbes, Manglar* 12(1), 55 - 64

**Mossel D.A.A., y Quevedo, Fernando (1967).** *Control Microbiológico de los alimentos*, CLEIBA, Lima, Perú: San Marcos editorial

**Oteo J, Alós J., (2004),** *Listeria y Listeriosis. Control de Calidad SEIMC.* Recuperado: <http://www.seimc.org/control/reviBacte/listeria.htm>

**Paciel Daniela y Medina. (2016).** *Enfermedad por Listeria monocytogenes.* Recuperado de [www.infectologia.edu.uy](http://www.infectologia.edu.uy)

**Parrilla Valero Fernando. (2011).** Estudio de incidencia de la listeriosis en España.(Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, España.

**Pérez Alarcón María Elizabeth. (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.

**Proyecto Regional concha. (s/f).** *Hivos People unlimeted* .Recuperado de <https://latin-america.hivos.org/proyecto-regional-concha>

**Ramos I. (1991).** *Aislamiento e identificación de Listeria spp. en productos hidrobiológicos frescos y procesados en nuestro litoral.* (Tesis de pregrado).Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

**Remacha MA, Herrera, JA Esteban, A Roiz, V Quiroga, L Parra, I. (3 de Julio del 2002).** Bacteriemia por *Listeria monocytogenes*. *Revista de Diagnóstico Biológico*, 51(3), 111-112.

**RENALOA (2011).** *Metodología analítica oficial microorganismos patógenos.* Recuperado de: [http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_Vol\\_I.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloa/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf)

**Ruiz Bolivar Zulema, Poutou Piñales Raúl Alberto, Carrascal Camacho Ana Karina. (2008).** *Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de Listeria spp.* Recuperado de [http://www.unicolmayor.edu.co/invest\\_nova/NOVA/NOVA10\\_ARTREVIS4\\_LISTE2.pdf](http://www.unicolmayor.edu.co/invest_nova/NOVA/NOVA10_ARTREVIS4_LISTE2.pdf)

**Sánchez Artola B. y Palencia Herrejón E. (10 de Octubre del 2010).** Infecciones por *Listeria*, *Medicine*, 10 (50) ,3368-3372

**Schobitz Renate, Ciampi Luigi y Nahuelquin Yanina.(2009).** *Listeria monocytogenes un peligro latente para la industria alimentaria.* Doi: 10.4206/agrosur.2009.v37n1-01

**Seoane, Mabel. (2013).** *Listeria monocytogenes.* *Revista chilena de infectología*, 30(4), 405-406. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182013000400009>

**Torres, Kirvis, Sierra, Sara, Poutou, Raúl, Carrascal, Ana, & Mercado, Marcela. (Enero del 2005).** PATOGENESIS DE *Listeria monocytogenes*, MICROORGANISMO ZONOTICO EMERGENTE. *Revista MVZ Córdoba*, 10(1), 511-543.

**Universidad CEU Cardenal Herrera. (2 de Agosto del 2010).** *Listeriosis (género listeria).* Recuperado de <https://blog.uchceu.es/eponimos-cientificos/liseriosis-genero-listeria/>

**USDA-FSIS. (2002).** Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Egg and Environmental Samples. Recuperado: [http://www.fsis.usda.gov/science/microbiological\\_lab\\_guidebook/index.asp](http://www.fsis.usda.gov/science/microbiological_lab_guidebook/index.asp).

**Vázquez-Boland J. A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakraborty, G. Domínguez-Bernal, W. Goebel, B. González- Zorn, J. Wehland, J. Kreft. (2001).** *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol* 14(3), 584-640

**Vera Alejandra, González Gerardo, Domínguez Mariana y Bello Helia. (4 de junio 2013) .** Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista Chilena de infectología.* Recuperado: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-10182013000400010](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182013000400010)

**Wesley Irene V., Fraser Ashton.( 4 de Abril del 1991 ).**Restriction enzyme analysis of *Listeria monocytogenes* strains associated with food - borne epidemics, American Society for Microbiolgy. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1905523>

**Wolfgang Ludwig, Karl-Heinz Schleifer and Whitman William B. (2009).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology- Family III. Listeriaceae fam. 38(1), 244

**Wong Hin chung. (2 de Diciembre del 2015).** *Listeria monocytogenes*. Recuperado de <http://microbiology.scu.edu.tw/MIB/wong/courses/special/ppt/listeria.pdf>