

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**UNIDAD DE POSGRADO**

**Prevalencia de *Listeria Monocytogenes* en salchichas tipo  
Huacho provenientes de los mercados de abastos del  
Cercado de Lima**

**TESIS**

para optar el grado académico de Magister en Ciencias de los Alimentos

**AUTOR**

**María Elizabeth Pérez Alarcón**

**Lima – Perú**

**2013**

## DEDICATORIA

*Este trabajo está dedicado a Dios Por haberme dado la existencia, Por guiar el sendero de mi vida Durante todo este tiempo.*

*A mi madre y mi Tío Que hicieron posible este logro.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi ASESORA, por su apoyo incondicional y tiempo Invertido en el desarrollo de esta investigación Mg. Q.F. María Elena Salazar Salvatierra

Y a todas aquellas personas que me apoyaron en la ejecución del presente trabajo.

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	7
II.	GENERALIDADES.	10
	2.1. Genero Listeria	10
	2.1.1. Taxonomía	10
	2.1.2. Características del microorganismo.	11
	2.1.3. Factores de virulencia	14
	2.1.4. Mecanismo de virulencia	15
	2.1.5. Serotipos	15
	2.1.6. Reservorios	17
	2.1.7. Mecanismos de transmisión.	18
	2.1.7.1. Transmisión por animales	18
	2.2. Listeriosis	19
	2.2.1. Dosis infecciosa	20
	2.2.2. Patogenia.	20
	2.2.3. Características de la enfermedad	22
	2.2.4. Epidemiología.	24
	2.2.5. Listeriosis esporádica y epidémica.	24
	2.2.6. <i>Listeria</i> y los alimentos	26
	2.2.7. <i>L. monocytogenes</i> en la industria	28
	2.2.8. Incidencia	31
	2.3. Mercados de abastos del cercado de lima	33
	2.3.1. Estructura de la Distribución	34
	2.3.1.1. Funciones de los mercados centrales mayoristas	34
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	36
	3.1. MATERIALES	36
	3.1.1. Cepas	36
	3.1.2. Medios de cultivo/Preparación por componente	36
	3.1.3. Material Desechable	37

3.1.4. Material de metal y de vidrio	37
3.1.4.1. Equipos	37
3.1.4.2. Reactivos	37
3.2. Métodos	;
3.2.1. Toma de Muestras	38
3.2.2. Homogeneización de la Muestra	38
3.2.3. Análisis Microbiológico	38
3.2.3.1. Enriquecimiento Selectivo	38
3.2.3.2. Aislamiento Selectivo	39
3.2.3.3. Conservación de cepas	39
3.2.3.4. Identificación bioquímica	39
3.2.3.5. Morfología microscópica	39
3.2.3.6. Prueba de la catalasa	39
3.2.3.7. Uso de carbohidratos	39
3.2.3.8. Reducción de nitratos	40
3.2.3.9. Movilidad	40
3.2.3.10. Hemólisis	40
3.2.3.11. Prueba del CAMP	40
IV. RESULTADOS	42
V. DISCUSION	52
VI. CONCLUSIONES	58
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

## RESUMEN

Se analizaron 60 muestras de Salchicha tipo Huacho de los Mercados de Abastos del Cercado de Lima, con la finalidad de determinar la incidencia de *Listeria monocytogenes*. Estas muestras se llevaron al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en recipientes estériles, refrigerados y se procesaron dentro de las 24 horas de colectadas.

Para el análisis microbiológico se utilizó la técnica según USDA- FSIS, que consta de tres fases: Pre-enriquecimiento, Enriquecimiento de la muestra y siembra en agares selectivos, pruebas Bioquímicas, Catalasa, Gram positivos y la prueba del CAMP para su confirmación.

La incidencia de *L. monocytogenes* en Salchicha tipo Huacho, en los Mercados de Abastos del Cercado de Lima es de 78%, siendo un valor considerable y que supera a los valores reportados en estudios a nivel internacional. Estos resultados permiten considerar que la Salchicha tipo Huacho se constituye como un alimento de riesgo potencial para la Salud Pública.

**Palabras claves:** *L. monocytogenes*, Agar Oxford, Salchicha tipo Huacho, CAMP.

## **ABSTRACT**

60 samples of the Huacho Sausage from the Food Markets in Cercado de Lima, in Lima, Peru, were analyzed in order to determine the incidence of *Listeria monocytogenes*.

These samples were taken to the Laboratory of Microbiology to the Faculty of Pharmacy and Biochemistry at the National University of San Marcos. They were taken in sterile containers for being refrigerated. Then they were processed within 24 hours of being collected.

The USDA-FSIS technique was used for microbiological analysis, which consists of three phases: Pre-enrichment of the sample, Sample Enrichment and Reseeding on selective agars. At the same time, some biochemical tests were applied, such as the positive Catalase test, the test of Great Positive, and CAMP test to confirm the results.

The incidence of the *Listeria monocytogenes* in the Huacho Sausage, from the Food Markets in Cercado de Lima, is 78%. This is quite high, as it exceeds the values reported in international studies.

These results support the conclusion that the Huacho Sausage is a food with a potential risk to the public health.

## I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos cárnicos y sus derivados como los embutidos (Salchicha tipo Huacho) son una amenaza a la salud pública.

La presente investigación estudió la presencia de *Listeria monocytogenes* en Salchicha tipo Huacho, que es un embutido crudo, curado por una masa hecha a partir de carne de porcino, bovino, ave, o equino, grasa de porcino y todos estos ingredientes adecuadamente triturados y mezclados con agregados de especias de aditivos que se expenden en los Mercados de Abastos del Cercado de Lima, estos productos se elaboran siguiendo métodos que son transmitidos de generación en generación en cuyo proceso no se tiene en cuenta las buenas prácticas de manufactura especialmente el almacenamiento y la distribución de las salchichas tipo Huacho, por este motivo la presente investigación se formuló como objetivos, detectar, aislar e identificar la presencia de *Listeria monocytogenes* en Salchichas tipo Huacho que se expenden en los mercados de abastos del Cercado de Lima, a partir de un medio microbiológico selectivo y métodos tradicionales.

Actualmente existen diversos microorganismos que contaminan los embutidos, como la *Listeria monocytogenes*, un bacilo corto, Gram positivo ampliamente distribuido en la naturaleza; se encuentra desde la flora bacteriana normal de hurones, chinchillas, rumiantes, humanos, aguas residuales, vegetales en descomposición, productos cárnicos y sus derivados. Los datos epidemiológicos implican a los alimentos como el vehículo más común para la transmisión de *L. monocytogenes* siendo el tracto gastrointestinal la vía de acceso más importante. (9), Además es una bacteria intracelular facultativa que sobrevive en macrófagos e invade células no fagocitadas como las células epiteliales, hepatocitos y células endoteliales.

La capacidad del microorganismo para penetrar el citoplasma de la célula proliferar y diseminarse a las células adyacentes es esencial para la expresión plena de su potencial patógeno (11). También se conoce que su unión a la célula huésped se produce por una proteína (integrina), luego es fagocitada por la célula huésped. En el fagolisosoma es sometida a un ambiente hostil con pH y ferritina bajos activando una exotoxina (listeriolisina O) que es capaz de lisar la membrana del fagolisosoma en 30 minutos y escapar al citoplasma (9).

La listeriolisina O, exotoxina hemolítica y citolítica es un factor crítico de virulencia de *L. monocytogenes* (9); luego la bacteria se disemina de célula a célula sin ponerse en contacto con el medio extracelular, lo que explica la necesidad de una inmunidad mediada por células, igualmente, el periodo de incubación en promedio es de 3 - 4 semanas con extremos de 3 – 90 días.

El riesgo de listeriosis está marcadamente elevado en las mujeres embarazadas, los tumores malignos, los pacientes a los que se administra corticoide y aquellos con infección por VIH los que presentan los cuadros inmunosupresores más frecuentes asociados con listeriosis. También produce enfermedades invasivas y no invasivas como infecciones en el embarazo, granulomatosis antiséptica, sepsis de origen desconocido, meningoencefalitis, infecciones focales y gastroenteritis que ocurren en huéspedes que consumen alimentos contaminados con *L. monocytogenes*.

Por otro lado se considera que el 1 - 5 % de los seres humanos son portadores intestinales asintomáticos de esta bacteria. Sin embargo, en mujeres embarazadas (en mayor porcentaje), recién nacidos, ancianos, pacientes con enfermedades neoplásicas y personas que tienen el sistema inmunitario deficiente *Listeria monocytogenes* es un patógeno importante de origen alimentario, que resiste a diversas condiciones ambientales como: pH bajo, altas concentraciones de sal, sobre todo tiene la capacidad de

sobrevivir a bajas temperaturas de refrigeración (2 - 4°C ) y a tratamientos insatisfactorios de pasteurización logrando constituirse en seria amenaza para la seguridad en la industria alimentaria. (4). En la actualidad, parece claro que el alimento contaminado es la vía más importante de su trasmisión, a través de los vegetales, productos lácteos, carnes y sus derivados como son los diferentes tipos de embutidos. Por lo expuesto, es que se escogió analizar la salchicha tipo huacho procedente de los mercados de abastos del Cercado de Lima.

Para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* se utilizó la técnica USDA- FSIS, que consta de tres fases: Pre-enriquecimiento, enriquecimiento de la muestra, siembra en agares selectivos y pruebas Bioquímicas.

## II. GENERALIDADES.

### 2.1. GENERO LISTERIA.

#### 2.1.1. Taxonomía

El Manual de Bergey integra el género *Listeria* en el denominado “Grupo de bacilos no esporulados grampositivos” junto con otros géneros: *Lactobacillus*, *Brochothrix*, *Renibacterium*, *Kurthia*, *Erysipelothrix*, *Caryophanon*. La Tabla N° 1 muestra las diferencias entre ellos. El género *Listeria* pertenece a una clase distinta dentro de la rama de *Clostridium-Lactobacillus-Bacillus*.

Dentro de esta filogenia *Listeria* está más cercanamente relacionada al género *Brochothrix*. 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. ivanovii* (subespecie *ivanovii* 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, *L. denitrificans* no pertenece al género *Listeria* y consecuentemente ha sido reclasificada como *Jonesiadenitrificans*. (Ver Tabla N° 2).

*L. monocytogenes* es reconocida generalmente como el principal microorganismo patógeno para el hombre dentro del género *Listeria*, mientras que *L. seeligeri* y *L. ivanovii*, en raras ocasiones han estado implicadas en infecciones a personas (34).

### 2.1.2. Características del microorganismo.

*Listeria monocytogenes* fue aislada en el siglo XIX por Hayem en Francia en 1891 y por Henle, dos años después, en Alemania. En la década de 1940, Pirie nombró al organismo *L. monocytogenes*, con la denominación de “*Listerella*” había sido adoptada anteriormente para un grupo especial de mohos, Martino y cols. En un estudio hecho en Cuba, demostró la presencia de esta bacteria en muestras de queso y embutidos. En este trabajo se analizaron 98 muestras de embutidos y ahumados y se tuvo como resultado una incidencia menor al 5% en relación a los derivados cárnicos. *L. monocytogenes* es un bacilo corto, regular, con extremos redondeados, cuerpo recto o ligeramente curvado, mide entre 0,5 -2 $\mu$  de largo, por 0,4-0,5 $\mu$  de ancho; a veces adopta forma de cocobacilo, se presenta aislado, en parejas, cadenas cortas o agrupado en “V” o en “Y”, puede agruparse también en empalizada, carece de cápsula, es Gram positivo, no es ácido alcohol resistente, y no presenta esporas (32, 44, 59).

Es un microorganismo psicrótrófico, cuyo límite de crecimiento está entre 1° a 45°C (aunque en estos extremos crece lentamente), con una temperatura óptima de 30 a 37°C. Por otro lado a pesar de las controversias *L. monocytogenes*, no sobrevive a una pasteurización comercial apropiadamente conducida (34), para que se destruya *L. monocytogenes* son necesarios 70°C, aplicados durante 2 a 3 minutos (44). En cuanto a su pH óptimo de crecimiento, está próximo a la neutralidad (7,2-7,6) (32), mientras que el mínimo pH requerido para la iniciación de crecimiento va de 5,0 a 5,7 a 4°C y de 4,3 a 5,2 a 30 °C (11). Aunque la mayoría de cepas crecen a pH 9,6 son inhibidas hasta cierto punto a pH por debajo de 4,5 sin embargo, la inhibición a bajo pH parece ser dependiente de la naturaleza del

ácido, ya que ácidos orgánicos (acético>láctico>cítrico) son más inhibitorios que el ácido clorhídrico (34).

**Tabla N° 1. PROPIEDADES DIFERENCIALES DE LOS BACILOS REGULARES NO ESPORULADOS.**

Género	Movilidad	Necesidad de O <sub>2</sub>	Crecimiento a 35°C	Catalasa	Ácido de glucosa
<i>Listeria</i>	+	Facultativo	+	+	+
<i>Brochotrix</i>	-	Facultativo	- <sup>a</sup>	+	+
<i>Erysipelothrix</i>	-	Facultativo	+	-	+
<i>Lactobacillus</i>	- <sup>b</sup>	Facultativo	+	- <sup>c</sup>	+
<i>Kurthia</i>	+ <sup>d</sup>	Aerobio	+	+	-
<i>Caryophanon</i>	+ <sup>e</sup>	Facultativo	+	-	+

Fuente. Seeliger y Jones 1986; Pascual 1999.

**Tabla N° 2. DIFERENCIACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO *Listeria***

Características	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>
Coloración Gram (+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Prueba de catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Movilidad en paraguas	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Producción de ácido a partir de :						
Glucosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Manitol	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
D – Xilosa	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
L-Ramnosa	(+)	(+/-)a	(-)	(+/-)a	(-)	(-)
Maltosa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Hidrólisis de esculina	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
□ Hemólisis	(+)b	(-)	(+)	(-)	(+)c	(-)
Prueba de CAMP ( <i>Staphylococcus aureus</i> )	(+)d	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
Prueba de CAMP ( <i>Rhodococcusequi</i> )	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)

Fuente: Seeliger and Jones, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1986

*L. monocytogenes* es capaz de crecer con una actividad de agua de 0,90 a 0,92. Asimismo, el microorganismo es anaerobio facultativo,

además de ser halotolerante, aun cuando la máxima tolerancia a la sal generalmente ocurre a pH neutro, (11, 12, 39) pudiendo sobrevivir así en presencia de niveles elevados de NaCl (30%) y en las concentraciones de nitritos que están permitidos en los alimentos. Además la congelación de los alimentos, la conservación a  $-18^{\circ}\text{C}$  y la congelación repetida, ejercen poco efecto sobre la bacteria ya que la daña pero no la inactiva (52).

Es catalasa positiva, oxidasa negativa y expresa una hemólisis del tipo  $\beta$  sobre el agar sangre (2); produciendo hemolisinas a valores de pH de 5 y 9 (el pH de muchos de los alimentos) cuando son incubados previamente a  $20^{\circ}\text{C}$  y  $32^{\circ}\text{C}$ , mientras que el máximo crecimiento y las unidades hemolíticas fueron detectadas a pH 7 (37).

La movilidad se debe a 4 flagelos peritricos y se manifiesta mejor entre  $20 - 25^{\circ}\text{C}$ , a esta temperatura, los flagelos son producidos y reunidos en la superficie celular, pero a  $37^{\circ}\text{C}$  la producción de flagelos es marcadamente reducida llegando a ser imperceptible o nula, reduciéndose el número de flagelos a uno o dos situados en la región polar. La bacteria se mueve de forma característica, mediante un lanzamiento rápido combinado con saltos y rotación (44).

Las listerias necesitan al menos cuatro vitaminas del grupo B (biotina, riboflavina, tiamina y ácido tióctico), también necesitan los aminoácidos cisteína, glutamina, isoleucina, leucina y valina. La glucosa mejora el crecimiento de todas las especies y a partir de este azúcar se produce ácido L (+) láctico. Si bien todas las especies de *Listeria* utilizan la glucosa por la vía de Embden-Meyerhof, algunas utilizan otros carbohidratos, tanto sencillos como complejos. El hierro es importante en su crecimiento, pero parece ser que *L. monocytogenes* no posee compuestos específicos que fijen el hierro y

satisface sus necesidades mediante movilización reductora del hierro libre, que se une a receptores de superficie (29).

### **2.1.3. Factores de virulencia**

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  $\beta$  en los eritrocitos y de la destrucción de las células fagocitarias. La listeriolisina O purificada tiene un peso molecular de 58KD, está formada por 504 aminoácidos, es una hemolisina soluble, se activa por sulfidrilo, ejerce su máxima acción a pH entre 5.0 a 5.5 (el pH de mucho de los alimentos), se produce durante el crecimiento bacteriano y su actividad es la de una lecitinasa o una fosfolipasa (29, 36, 45). La LLO ha sido detectada en todas las cepas de *L. monocytogenes*, incluso en algunas que *no eran hemolíticas, pero no en L. welshimeri, ni en L. grayi, ni en L. murrayi*. Mientras que *L. ivanovii* y *L. seeligeri* producen exotoxinas tiordependientes que son parecidas, pero no idénticas a la listeriolisina O, *L. ivanovii* produce grandes cantidades de exotoxinas y *L. seeligeri* sólo produce cantidades insignificantes (29).

Por otro lado la expresión fenotípica de colonia “rugosa” o “lisa” ha sido considerada para referirse a la virulencia en algunos microorganismos patógenos entéricos como *Salmonella*. Parece que las cepas isogénicas de *L. monocytogenes* con las atribuciones fenotípicas de lisa y rugosa puede variar su capacidad de causar infección, lo cual ha sido demostrado mediante un estudio de la cepa “rugosa” de *L. monocytogenes* serotipos 4b y 1/2a que no causaron infección invasiva en un animal, mientras que la variante isogénica “lisa” resultó invasiva. De la misma forma se dio para las variantes

isogénicas lisas y rugosas de un serotipo 1/2a de la misma bacteria (56).

Los productos que han sido considerados como principales factores de virulencia en *L. monocytogenes* son: las internalinas, la proteína de superficie p104, la hemolisina (listeriolisina O), la proteína ActA, las fosfolipasas, las metaloproteasas, las pcl proteasas y ATPasas y la proteína p60 (que se encuentra en las colonias rugosas en niveles reducidos). Todos estos factores participan de manera específica en el proceso infeccioso permitiendo a la bacteria invadir los macrófagos y las células de la mayor parte de los tejidos de los hospedadores donde puede proliferar (8, 52, 53).

#### **2.1.4. Mecanismo de virulencia**

Las evidencias señalan que el modo primario de transmisión de *L. monocytogenes* del reservorio ambiental a humanos es por la ruta de origen alimentario (54). Los mecanismos de patogenicidad no son comprendidos con claridad, pero la infección depende de una variedad de factores que incluyen el estado inmunitario del hospedador, la cantidad de inóculo y la virulencia específica de la cepa de *L. monocytogenes* (52).

*L. monocytogenes* es un microorganismo patógeno intracelular invasivo que puede cruzar la barrera placentaria y penetrar el Sistema Nervioso Central (SNC) (53) teniendo como prerrequisito esencial para el crecimiento bacteriano la listeriolisina, la cual participa en la lisis de la membrana fagolisosomal permitiendo la invasión de la bacteria y el libre acceso al citoplasma de la células del hospedero (21). Por otro lado existen evidencias que permiten asegurar que la pérdida de hemólisis a través de la mutagénesis puede permitir la perdida de la virulencia. Otros factores que pueden también modificar la virulencia intrínseca del organismo son los cationes divalentes

como el hierro o el magnesio, determinado por su estructura o su capacidad para producir toxinas extracelulares (56).

### 2.1.5. Serotipos

*L. monocytogenes*, está representada por 13 serovariedades, algunas de las cuales son compartidas por *L. innocua* y por *L. seeligeri*. Si bien *L. innocua* está representada sólo por 3 serovariedades, a veces es considerada una variante no patógena de *L. monocytogenes*. En 1966, Gray y Killinger indicaron que los serotipos de *Listeria* de ningún modo están relacionados ni con el hospedador, ni con el proceso patológico, ni con el origen geográfico, lo cual generalmente se confirma por los aislamientos realizados en alimentos, aunque las serovariedades 1/2a y 4b presentan algunas diferencias geográficas (29).

*L. monocytogenes* posee los antígenos O (somático termoestable) y H (flagelares termolábiles) identificados, que se usan para subdividir a ese microorganismo en varias serovariedades. Respecto a los fagos, éstos están presentes en casi todas las especies conocidas y ascienden a unos 31 pero no se han aislado en *L. grayi* (44).

Cuadro N° 01: Los **serotipos de las especies de *Listeria***

SEROTIPOS	SUBTIPOS	FACTORES	VARIEDADES
Serotipo 1		Factores O	1, 2
Serotipo 2		Factores H	A, B
Serotipo 3		Factores O	2, 4
		Factores H	A, B
Serotipo 4	Subtipo 4 <sup>a</sup>	Factores O	5a,b
		Factores H	A,B,C
	Subtipo 4b	Factores O	5a,c
		Factores H	A,B,C

- *Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y Bebidas*. 2da Edición. Editorial Díaz de Santos 1999.

La frecuencia de estos serotipos es: serotipo 1, 33%; serotipo 2, < 1%; serotipo 3, <1%; serotipo 4, 65% (44). El serotipo 1/2 fue hallado con mayor frecuencia que el serotipo 4 en la leche cruda y en el queso, mientras que el serotipo 1 ha sido hallado en los alimentos marinos y en las hortalizas. Las tres serovariedades más comunes aisladas en los alimentos, en orden decreciente, son 1/2a, 1/2b y 4b mientras que en la listeriosis humana las más comunes son 4b, 1/2a y 1/2b (29).

#### **2.1.6. Reservorios**

Son reservorios de *L. monocytogenes*: el ambiente, el suelo, el agua superficial de los ríos, estanques, alcantarillados, el lodo de aguas residuales (66), el agua fresca, dulce y salada, los vegetales, las hojas de arbustos, la materia vegetal descompuesta parece ser una buena fuente de la cual es aislada esta bacteria (5). Se ha encontrado también en el hombre, los animales domésticos, y salvajes, desperdicios del matadero, leche de vacas normales, mastíticas, leche humana (60), heces de humanos y animales (11).

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. Por consiguiente, el alimento se puede contaminar en cualquier eslabón de la cadena alimentaria, y el almacenaje frío no inhibe el crecimiento de las listerias (52).

Se sabe que la tierra es un reservorio natural de *L. monocytogenes*, es por eso que existe la posibilidad de que los humanos lleguemos a infectarnos con plantas que han estado contaminadas con la tierra en

la que creció dicha bacteria (41). 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 (67).

*L. monocytogenes* ha sido aislada de ensilado producido del maíz, grass, centeno, avena y plantas leguminosas, particularmente cuando no ha sido fermentado apropiadamente, esto sumado a la presencia de hongos y levaduras lo hace propicio como substrato para *L. monocytogenes* encontrándose en éste a veces en poblaciones mayores de  $1,2 \times 10^4$  células/g, además la bacteria puede persistir en el ensilado por 10 a 12 años (5, 41). Una baja calidad del ensilado, particularmente los que tienen alto pH es más fácil que se contaminen con *L. monocytogenes*, pero también puede estar presente en ensilado de buena calidad, con un pH de 4,0 o menos (5).

### **2.1.7. Mecanismos de transmisión.**

La listeriosis se transmite a través de tres vías principales: contacto con los animales, infección cruzada entre recién nacidos en el hospital e infección transmitida por los alimentos (4). Una vía de infección importante es la infección transplacentaria y adquisición directa por el canal vaginal la cual parece ser la causa de infección perinatal aunque la fuente de infección o colonización de la madre no ha sido identificada (54). Existen evidencias limitadas que indican que la listeriosis puede ser de origen aéreo, ya que las células de *L. monocytogenes* albergadas en polvo y suciedad pueden ser inhalados por humanos, y luego causar la forma neumónica de listeriosis (41).

#### **2.1.7.1. Transmisión por animales**

La listeriosis tiene una amplia variedad de huéspedes animales tanto domésticos como silvestres, comprobándose la infección en gran número de

mamíferos, en aves, e incluso en animales poiquiloterms (más de 50 animales diferentes). Se sabe que la especie doméstica más susceptible es la ovina, siguiéndole en importancia la caprina y la bovina pero no se conoce la frecuencia con que ocurre la enfermedad en los animales. En algunos países latinoamericanos se han descrito brotes en ovinos, en el Perú se comprobó la enfermedad en alpacas; en Argentina, en pollos y en Uruguay en canarios (1).

Se cree que la principal fuente de listeriosis en los animales es el ensilado, especialmente para la oveja y que el pico de máxima incidencia de la enfermedad para los animales se observa en invierno y principios de la primavera (36).

Por otro lado, esta bacteria ha sido aislada de las materias fecales de un 20% a 30% de mujeres gestantes, a pesar de eso, la cantidad de enfermos no es grande, muchas mujeres, de las que se aísla el microorganismo de las materias fecales, dan nacimiento a niños sanos. Otras condiciones concurrentes, tales como estrés u otros pueden intervenir para desencadenar la enfermedad. En otros casos la infección se produjo por vía oral, donde se reportó como vehículo del microorganismo a la leche (1).

## **2.2. LISTERIOSIS**

Está bien establecido que la ingestión de *L. monocytogenes* puede causar una enfermedad humana llamada listeriosis (11, 52). El Servicio de Laboratorios de Salud Pública de Inglaterra y Gales

(PublicHealthLaboratoryService, PHLS) define un caso de listeriosis como un paciente que sufre una enfermedad con sintomatología compatible con la listeriosis y del cual se ha aislado *L. monocytogenes* en un lugar normalmente estéril (generalmente sangre o líquido cefalorraquídeo)” (4).

En 1997, el Centro de Control y Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (Center of Disease Control, CDC) señaló que de todas las enfermedades de origen alimentario el nivel de hospitalización fue más alto para personas infectadas con *L. monocytogenes* (88%). Similarmente, de todas las bacterias patógenas considerados por CDC, *L. monocytogenes* tuvo el nivel más alto en casos de mortalidad ya que de las personas hospitalizadas con listeriosis el 20% murieron. 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 (34). Aunque se ha reportado que la listeriosis es poco frecuente en pacientes con VIH y existen únicamente alrededor de unos 50 casos publicados (64).

Los rasgos clínicos de esta enfermedad van desde una gripe benigna a meningitis o meningoencefalitis (2). Aunque se sabe que cualquier persona puede ser infectada con *L. monocytogenes*, muchas de ellas pueden no tener síntomas ya que la listeriosis no se desarrolla necesariamente en todas las personas que están en contacto con la bacteria (41).

### **2.2.1. Dosis infecciosa**

La dosis infecciosa de *L. monocytogenes* depende de varios factores, que incluyen el estado inmunológico del hospedador, la exposición a determinados alimentos, es probable que las características microbianas sean factores de riesgo importantes para contraer la enfermedad.

La aparición y el curso de la infección pueden depender perfectamente de los factores de virulencia y de la dosis infecciosa. Sin embargo, debido a que las técnicas de recuento no son fiables del todo y que el tiempo transcurrido entre el consumo y el análisis del alimento contaminado puede permitir la multiplicación o la muerte de las listerias, es posible que los resultados no siempre indiquen la cantidad de listerias ingeridas (52).

### **2.2.2. Patogenia.**

La patogenidad de *Listeria* está relacionada esencialmente con su capacidad de multiplicarse en el organismo. Es una infección más que una toxoinfección y tiene como mecanismo crucial de patogenidad el parasitismo intracelular, lo cual implica una secuencia de eventos en el que cada factor de virulencia permite el parasitismo intracelular de este microorganismo patógeno (53).

El modo de transmisión a humanos ha sido difícil de determinar, aunque algunas evidencias incluyendo la frecuente ocurrencia de síntomas gastrointestinales al principio de la bacteremia señala al intestino como la usual puerta de entrada (3). Recientes estudios han mostrado que *L. monocytogenes* está en el intestino de aproximadamente el 15% de la población (29) y que el intestino grueso es el principal reservorio en el organismo humano (13). Una vez que ingresa al organismo, la bacteria puede invadir y multiplicarse en numerosos tipos de células en su hospedero, incluyendo células

epiteliales (enterocitos), fibroblastos, células parenquimáticas (hepatocitos) y células endoteliales (53).

*L. monocytogenes* causa así enfermedades al penetrar la membrana del tracto gastrointestinal, observándose un espectro de enfermedades severas como resultado de la exposición a *Listeria* que va desde portadores asintomáticos a través de una enfermedad gastrointestinal no invasiva a condiciones sistémicas o invasivas (13), ya que la infección no está localizada en el sitio de entrada sino que implica la entrada y multiplicación en una gran variedad de tipo de células y tejidos, aunque conserva cierto tropismo hacia determinados órganos siendo el principal sitio de infección el hígado, pero en las personas adultas no embarazadas, esta bacteria tiene un tropismo específico hacia el sistema nervioso central (52), desarrollando así una lista parcial de enfermedades que incluye bacteremia, meningitis bacteriana, conjuntivitis, infección del SNC, infección cutánea, encefalitis, endocarditis, meningoencefalitis, puede además ocasionar: abortos, nacimientos prematuros, enfermedad neonatal, osteomielitis, peritonitis, infección pleural, neumonía, enfermedades prodromal en mujeres embarazadas y septicemia. Los síntomas asociados con listeriosis: diarrea, fiebre, dolor de cabeza y mialgia son a menudo el resultado de altas dosis de *L. monocytogenes* en individuos saludables (13). Pero también pueden ocurrir infecciones focales en personas inmunosuprimidas resultando en artritis, osteomielitis, abscesos espinales o del cerebro, peritonitis y colecistitis, en cuanto a las personas con listeriosis diseminada éstas pueden sufrir de hepatitis (41).

Por otro lado hay una amplia evidencia de que la transmisión de *L. monocytogenes* de un humano a otro ocurre, por diseminación de la bacteria causante a través de secreciones nasales y de la garganta, orina, heces, secreciones conjuntivales, pus y sangre. También se ha

reportado que las personas después de desarrollar listeriosis continúan eliminando *L. monocytogenes* en las heces por un tiempo indefinido, más aún personas aparentemente saludables algunas veces también eliminan la bacteria en sus heces, o puede ser aislada de una o varias partes de su cuerpo lo que significa que algunas veces hay transmisión de persona a persona (41). Mucho más aún algunas investigaciones clínicas y epidemiológicas indican que los individuos que anteriormente eran asintomáticos pero cuyo tracto gastrointestinal albergaba *L. monocytogenes*, pasaron a ser sintomáticos posiblemente por causa de un agente coinfectante (52). Hasta que queden establecidos los detalles de la patogenie debemos esforzarnos por garantizar que los alimentos estén libres de la bacteria (36).

### **2.2.3. Características de la enfermedad**

En las personas, la listeriosis no se caracteriza por una sucesión única de síntomas ya que el curso de la enfermedad depende del estado del hospedador, así en los enfermos no perinatales con factores predisponentes, la bacteremia es más frecuente, mientras que las infecciones del SNC son los síndromes clínicos predominantes diagnosticados en enfermos sin enfermedad subyacente (52).

En mujeres embarazadas, sobretodo en el segundo trimestre de gestación, la presencia de *L. monocytogenes* puede dar lugar a síntomas como los de la influenza, con fiebre, dolor muscular, dolor de cabeza o la infección listeriósica puede ser asintomática. La bacteria puede ingresar al feto a través de la placenta de la madre, quien estaría predispuesto a sufrir severas consecuencias por la infección de la madre. La enfermedad puede ser de comienzo precoz (a los 2-3 días del nacimiento) después de la infección en el útero, o de comienzo tardío (más de 85 días después del nacimiento) al ser infectado el recién nacido durante el parto o, posteriormente en el periodo neonatal. En el caso de la listeriosis neonatal de comienzo

precoz, los síntomas suelen ser: neumonía, septicemia y abscesos diseminados, con una tasa de mortalidad del 40-50%, en la listeriosis neonatal de comienzo tardío el principal rasgo de enfermedad es la meningitis; en este caso la mortalidad es aproximadamente de un 25% (34, 44). En personas adultas sin embarazo la septicemia y meningitis son el resultado de una infección listeriósica, aunque también puede ocurrir gastroenteritis e infecciones de órganos (13). Además la bacteria puede causar lesiones cutáneas localizadas sin desarrollo sistémico en las personas que atienden o manipulan animales infectados (34).

Por otro lado *L. monocytogenes* puede causar también mastitis en las vacas, si bien es cierto que los casos descritos son pocos, ya sea porque no se ha investigado la presencia de este microorganismo o porque en realidad su ocurrencia es rara. La mastitis por *Listeria* varía en severidad, desde la forma subclínica hasta la aguda y crónica. La eliminación del microorganismo por la leche es prolongada y puede tener repercusiones en la salud pública, sobretodo porque algunos autores manifiestan que la pasteurización no ofrece garantías si el recuento viable de esta bacteria es alto antes del tratamiento calórico (49).

#### **2.2.4. Epidemiología.**

La capacidad del organismo para sobrevivir y crecer en condiciones adversas y la severidad de la enfermedad hace que *L. monocytogenes* sea un microorganismo patógeno de origen alimentario de alto riesgo. La mayoría de casos humanos son causados por los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b (13, 22).

Muchos casos leves de listeriosis ocurren esporádicamente y no son detectados generalmente. Sin embargo hay casos esporádicos y grandes brotes donde se ha señalado al alimento como vehículo de infección (4).

### **2.2.5. Listeriosis esporádica y epidémica.**

La listeriosis humana ocurre generalmente de manera esporádica (19) es así como en los hospitales se dan infecciones cruzadas por *L. monocytogenes* entre niños recién nacidos infectados congénitamente y recién nacidos aparentemente sanos (29).

No se conoce bien la incidencia de listeriosis humana, porque no en todos los países la enfermedad es de declaración obligatoria (45). Por otro lado se comenta también que el aumento brusco de los casos de listeriosis transmitida por alimentos en los años 80 pudo ser debido a la existencia de infecciones simultáneas producidas por algún otro microorganismo patógeno, como por ejemplo *Salmonella enteritidis*, ya que la incidencia de los aislamientos humanos de este último microorganismo es paralela a los hallazgos de *L. monocytogenes* en algunas personas, o que la infección a partir del tracto gastrointestinal es favorecida por las toxinas de *Escherichiacoli* y posiblemente por el uso de antiácidos y cimetidina que neutralizan la acidez del estómago que, si no fuese neutralizada, inhibiría o destruiría las listerias (29), aún cuando también es posible que en la listeriosis de origen alimentario el tipo de alimento pueda ser importante para evitar el efecto bactericida del bajo pH del estómago (34). Ya que la acidez gástrica puede jugar un rol protector al matar el organismo ingerido, existen estudios que han demostrado que la reducción de la acidez gástrica permite que se requiera pocos organismos para establecer la infección invasiva a través del tracto gastrointestinal (56), lo que permite afirmar entonces que el uso de laxantes y antiácidos incrementa el riesgo de listeriosis (58).

El aislamiento de *L. monocytogenes* del cuello uterino en vacas lecheras explicaría por qué la leche cruda puede ser una fuente de infección para las mujeres embarazadas, como el caso que se dio en

Inglaterra aislándose *L. monocytogenes* del cuello uterino de algunas mujeres con abortos repetidos, lo cual señala la importancia de este microorganismo como causa de aborto, pero además en Israel tres mujeres con abortos repetidos infectaron al parecer a sus maridos. En muchos casos producidos, las mujeres referían en sus antecedentes el consumo de leche cruda de vaca o de cabra, se han publicado al respecto casos de abortos y de fetos muertos en vacas, ovejas, yeguas, conejas y cobayas después de la infección con *L. monocytogenes*, la cual además produce focos necróticos múltiples en los órganos internos de los animales jóvenes, y con no poca frecuencia también meningitis (32). Pero en la amplia mayoría de grandes brotes transmitidos a través de los alimentos, la cepa causante de la epidemia ha pertenecido a una de estas dos serovariedades: 1/2a o, más frecuentemente, 4b (29). En el Perú se han aislado *L. monocytogenes*, serovariedad tipo 4d y 4b de 3 casos fatales de listeriosis neonatal y de 5 fetos abortados (23).

De las 13 serovariedades comúnmente descritas de *L. monocytogenes*, sólo 3 (4b, 1/2a y 1/2b) son responsables de los principales casos esporádicos, así como de los epidémicos. La serovariedad 4b ha sido relacionada con casi la mitad de los casos en Europa, mientras que las serovariedades 4b, 1/2a y 1/2b fueron relacionadas con casos producidos en Norteamérica. No está claro la asociación que existe entre un serotipo dado y una forma clínica particular de listeriosis o un hospedero particular, sin embargo es de particular interés conocer también que *L. monocytogenes* serovariedad 4b ha causado casi todos los recientes brotes de listeriosis de origen alimentario, llevando a la interrogante de si existe una virulencia incrementada de esta serovariedad, mejor adaptación a los alimentos, a humanos o a una distribución en el ambiente (51).

#### **2.2.6. *Listeria* y los alimentos**

Pirie en 1927 expresó: “la infección puede producirse por inoculación subcutánea o mediante la alimentación y se piensa que es a través de la alimentación como se extiende esta enfermedad en la naturaleza” (4).

Es probable que de vez en cuando la mayor parte de alimentos crudos o ligeramente elaborados estén contaminados con especies del género *Listeria*, por lo tanto, debe esperarse la presencia de este microorganismo en la mayoría de productos alimenticios de esta naturaleza (4). Aunque esté presente en alimentos crudos de ambos orígenes: vegetal y animal, tales como: huevos, leche cruda, vegetales, carnes crudas de res, pollo y pescado, también puede estar presente en alimentos cocinados debido a la contaminación post-proceso, habiéndose aislado *L. monocytogenes* de alimentos como: leche fluida pasteurizada, queso (particularmente variedades blandos y madurados), helados, leche seca libre de grasa, crema de leche, leche chocolatada, leche ácida, chorizo de carne cruda fermentada, carnes cocidas (de todos los tipos) y pescado ahumado. Si bien es cierto *L. monocytogenes* está inicialmente presente en baja cantidad en un alimento contaminado, el organismo puede multiplicarse durante el almacenamiento, aún cuando se encuentra en refrigeración (9,11,13).

De todos los productos lácteos, el queso es el que ha sido más ampliamente examinado por su conocida asociación con listeriosis de origen alimentario, pero el organismo también ha mostrado sobrevivir en productos como manteca, suero de leche cultivada y aún yogurt, pareciendo la bacteria mucho más resistente que los coliformes en estos últimos y probablemente en queso, concluyéndose así que los productos libres de coliformes no son necesariamente libres de contaminación con *L. monocytogenes*, así como de la presencia de otras bacterias comunes psicotróficas en la leche como *Pseudomonas*

que se ha mostrado que puede enfatizar o aumentar el crecimiento de *L. monocytogenes* en la leche (11).

Considerando lo anterior algunos países han fijado límites legales en el número de organismos que son permisibles en los alimentos, de modo especial en los productos listos para comer, mientras que otros han propuesto pautas o criterios que no tienen categoría legal. Estados Unidos tiene uno de los criterios más rígidos, según los cuales *L. monocytogenes* ha sido denominada un “adulterante” por lo tanto su presencia es inaceptable. La Comunidad Europea (CE) sobre la leche y productos lácteos especifica la tolerancia cero en los quesos blandos y la ausencia del organismo en 1g de otros productos. Basándose en datos científicos existentes, países tales como Canadá, Gran Bretaña y Dinamarca no consideran cero tolerancia para *L. monocytogenes* en algunas clases de alimentos (13, 29). En nuestro país la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA) considera a *L. monocytogenes* un microorganismo de riesgo moderado directo, de diseminación limitada, es decir es un microorganismo patógeno que no debe estar presente en el alimento o bebida en cantidades que representen un riesgo a la misma (10).

Aunque la transmisión de la listeriosis por alimentos, no ha sido confirmada en voluntarios humanos, la leche contaminada cruda o pasteurizada, ha sido la fuente de infección más sospechosa en los últimos años (42), desde aquel brote importante que hubo en Alemania en 1949–51 que estuvo relacionado con el consumo de leche cruda (27).

Las investigaciones epidemiológicas de brotes y casos esporádicos de listeriosis nos muestran claramente que el consumo de alimentos contaminados es responsable de una alta proporción de casos de listeriosis humana (51, 61). Desde los años 80, los progresos en detección microbiológica e investigaciones epidemiológicas han

demostrado que todas las clases de alimentos, en cada etapa de la cadena alimentaria, puede transmitir la enfermedad (13), pero por la naturaleza ubicuitaria del organismo, ha sido casi imposible eliminarlo de la cadena alimentaria, ya que la capacidad de *L. monocytogenes* de crecer a temperaturas de refrigeración, unido a la ocurrencia de esta bacteria en todo tipo de alimento, hacen de ésta una seria amenaza para los consumidores susceptibles y para la industria de alimentos (11, 13, 55)

### **2.2.7. *L. monocytogenes* en la Industria.**

Por su ubicuidad *L. monocytogenes* se encuentra en zonas sucias y zonas húmedas; en la industria se encuentra en suelos, desagües, aire acondicionado, proximidades de pasteurizadores y enfriadoras de leche, neveras, gotas de condensación, mataderos, industria de la carne y lugares similares, puede ingresar con el ensilado, las vacas, los pájaros, etc. Por estas circunstancias, *L. monocytogenes* tiene fácil acceso a los productos alimenticios en las distintas fases de su elaboración (27, 45). La entrada de esta bacteria ha sido detectada en la alcantarilla, y en el agua estancada, aún más *L. monocytogenes* puede adherirse a varias clases de superficies (vidrio, goma, acero, etc.) y formar así biopelículas. La bacteria sobrevive también después del lavado de manos y en aerosoles en suspensiones, además los efluentes contaminados de plantas de procesamiento de alimentos, donde el organismo puede crecer, incrementan la contaminación de Listeria en el ambiente (51).

Los productos lácteos pueden ser particularmente susceptibles de contaminación con Listeria porque las vacas pueden eliminar el microorganismo en la leche en poblaciones de  $10^3$  células/mló más, de esta manera la leche cruda puede introducir a la bacteria dentro de la planta de productos lácteos, o alimentos hechos con leche cruda y una vez que está presente en los alimentos, es posible que *L. monocytogenes* compita exitosamente con otra microflora, sobreviva y

crezca. La capacidad de *L. monocytogenes* de proliferar a temperaturas de refrigeración puede hacer que alimentos refrigerados se encuentren especialmente con poblaciones más altas de *L. monocytogenes* que lo usual (5).

Hay evidencias circunstanciales que la contaminación de áreas de materias primas y producción de alimentos probablemente derivan de fuentes ambientales. La erradicación completa de tales organismos ubicuos que tienen la propiedad de sobrevivir y multiplicarse en ambientes aparentemente inhóspitos es imposible (34).

Las especies involucradas de manera frecuente con los alimentos son *L. innocua* y *L. monocytogenes*, esta última está presente en una amplia variedad de materias primas alimenticias siendo los productos de mayor riesgo aquellos en los cuales el microorganismo puede estar presente con una gran incidencia o en gran cantidad en la materia prima, en los cuales no exista un proceso que lo reduzca o elimine y además permita el crecimiento en el producto terminado, siendo consumido éste sin ningún tratamiento posterior, estos son: productos tales como los quesos de pasta blanda madurados por mohos elaborados con leche cruda, los cuales han sido en varias ocasiones la causa de listeriosis transmitida por los alimentos. Muchos de estos quesos elaborados a partir de leche cruda se fabrican en pequeñas granjas y casi todos los procesos se basan en prácticas tradicionales utilizando para su fabricación leche cruda procedente de distintas variedades de animales, dependiendo del tipo de queso. Las condiciones de temperatura (8-12°C) durante la maduración, el aumento del pH (6-7,0) y el mayor contenido en humedad de estos quesos de pasta blanda (45-55%) los hacen vulnerables al crecimiento de bacterias psicrótrofas patógenas como *L. monocytogenes*. Frecuentemente puede aislarse a esta bacteria a partir de las heces de rumiantes y se cree que la contaminación de las

ubres por heces probablemente sea la principal vía por la que el microorganismo llega a la leche cruda.

*L. monocytogenes* es un contaminante común de la leche cruda pudiendo proceder también del equipo de ordeño y de los tanques para su almacenamiento posterior. Algunos trabajos han mostrado que la contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes* se debería a su presencia directa en la leche a partir de una infección mastítica en la ubre, pero se cree que esto tan sólo sucede en raras ocasiones (4). El suministro de agua contaminada también es una de las causas más frecuentes de contaminación extrínseca en la granja e incluso a veces en el propio centro de pasteurización. Los insectos, los roedores, la suciedad y el estiércol contribuyen también a la contaminación de la leche con bacterias patógenas.

Es evidente, en efecto, que el hombre puede contaminar la leche en cualquiera de las fases que median entre la producción y el consumo (34). Pero el microorganismo también puede introducirse como un contaminante tras el procesado, ya que como psicrótrofo, está selectivamente favorecido por el uso de condiciones de refrigeración y como la leche cruda ha sido pasteurizada a una elevada temperatura, cualquier contaminación tras el procesado no sería objeto de la presión competitiva normal, ya que sólo otros pocos microorganismos estarían presentes (4).

#### **2.2.8. Incidencia**

La listeriosis es una enfermedad rara, la frecuencia evaluada durante los últimos años mediante vigilancia pasiva en algunos países europeos y en Canadá, indican que está comprendida entre 2 y 7 casos por millón de personas. Un cálculo más exacto de 7,4 casos por millón de personas fue obtenido mediante un estudio de vigilancia activa en los Estados Unidos entre 1989 y 1990 en una población de 19 millones de personas. Pero desde 1990, en los Estados Unidos, se

ha observado una disminución en el número de casos (44%) y en el número de muertes (48%) atribuibles a listeriosis, que indica que las medidas tomadas en la industria alimentaria y las recomendaciones a las personas en riesgo máximo de contraer la enfermedad han resultado eficaces. La incidencia de la listeriosis en Inglaterra y Gales está en descenso, similar en Estados Unidos (61). Aunque en Suecia el número de casos se ha incrementado de 30 a 53 casos durante el año 2000 (63). La listeriosis es reportada principalmente en los países industrializados, los predomios en África, Asia y América del Sur se desconocen o son bajos, no se sabe si esta diferencia refleja modelos de consumo y hábitos dietéticos diferentes, diferencias en la sensibilidad de los hospedadores, tecnología diferente de la elaboración y almacenaje de los alimentos, o falta de instalaciones de laboratorio o porque no se investiga la bacteria. (52).

Aunque la incidencia de listeriosis es relativamente baja y las consecuencias de la infección pueden ser severas, aproximadamente un 1 a 15% de la población saludable es portador de *L. monocytogenes* en su tracto intestinal sin signos de enfermedad (29, 52), lo cual ha sido demostrado en España mediante un estudio de portadores, obteniendo una frecuencia global del 3,8% con una incidencia del 18% en varones adultos y de 31% en mujeres embarazadas (44), aunque según otro estudio tomando como variable la edad, personas de 30 años o más han bajado substancialmente el nivel de portador (7%) comparado con las personas jóvenes (32%). Sin embargo otros autores han afirmado que los portadores de *L. monocytogenes* son más comunes en contactos de los pacientes con listeriosis que en la población general (57). 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% (4).

Ya que la prevalencia reportada de *L. monocytogenes* en la población y en alimentos comúnmente ingeridos es más alta que la incidencia reportada de listeriosis, algunos expertos creen que la ingestión de niveles bajos de *L. monocytogenes* puede no resultar en enfermedad y de esta manera, puede no constituir un peligro general de Salud Pública (13), pero la enfermedad también se presenta con frecuencia en individuos por lo demás sanos, quienes en Inglaterra y País de Gales, representarían el 18% de los casos que se dan en personas adultas (2).

Siendo la incidencia de la listeriosis humana de origen alimentario tan baja y esporádica, es de gran interés conocer el origen de las cepas de *L. monocytogenes* causantes. Aunque se puede suponer que los brotes atribuidos a los productos lácteos son consecuencia de la diseminación de cepas de listerias virulentas a la leche, esto no siempre se confirma (30), ya que la leche puede ser contaminada con fuentes ambientales y muy raramente las vacas sufren mastitis, eliminando en tales casos más de  $10^3$  UFC/ml a través de la leche (51), lo cual fue confirmado con un caso en el que se identificó en un infante que la meningitis listérica que desarrolló fue después de la ingestión de leche de una vaca con mastitis producida por *Listeria* (54).

La asociación de listeriosis con el consumo de leche soporta la hipótesis que *L. monocytogenes* es un microorganismo patógeno transmitido a seres humanos de animales infectados o sus bioproductos y que la ingestión del microorganismo es un mecanismo de infección, lo cual indica que la leche, además de otros productos, debería ser considerada un posible vehículo de infección en listeriosis.

### **2.3. MERCADOS DE ABASTOS DEL CERCADO DE LIMA.**

El área metropolitana de Lima, conocida como Lima Metropolitana o Lima-Callao, es la metrópoli conformada por el incremento de varias ciudades extendiéndose hacia el norte, sur y este, la cual abarca gran parte de las provincias de Lima y del Callao. El área metropolitana de Lima, se distribuyen 49 distritos, que son parte integrante de la Provincia de Lima (43 distritos) sumada a la Provincia Constitucional del Callao (6 distritos). El Cercado de Lima, es el que contiene a los mercados de abastos cuya delimitación espacial es el que abarca el estudio.

Los Mercados de Abastos del Cercado de Lima son centros de abastos o lugares públicos donde se compran y venden mercancías. Estos están ubicados en el Cercado de Lima, con énfasis o linderos a los que son propiedad de la Municipalidad de Lima. Incluyen el Mercado Central, Mercado Aurora, Mercado Santa Rosa, Mercado Elio y Mercado San Idelfonso. Existen mercados más pequeños que se circunscriben en el Cercado de Lima y que sirvieron para tomar las muestras, estos se describen en el Capítulo de resultados.

Los mercados centrales mayoristas o mercados de abastos desempeñan el rol principal de distribución de los alimentos crudos y frescos, hecho que consiste en reunir, de acuerdo con los planes, alimentos crudos y frescos, tales como frutas, productos marítimos, carnes comestibles, etc., indispensable en nuestra vida cotidiana, además de determinar sus precios razonables y distribuirlos establemente a los consumidores públicos.

Los alimentos crudos y frescos se caracterizan por la dificultad de su conservación por un largo período, debido a su frescura fácil de perder, y por sus precios variables según la variación de la cantidad de suministro, causada por la fluctuación del volumen de producción,

susceptible de influencia por parte del clima y otros fenómenos naturales.

Por estas razones, los mercados centrales mayoristas desempeñan el papel de estabilizar el régimen alimenticio del público mediante la distribución segura y estable de alimentos. Con tal fin, las entidades públicas locales establecen los mercados centrales mayoristas, los administran y gestionan bajo la autorización del Ministerio de Agricultura y Pesquería, de acuerdo con la Ley de Mercados Mayoristas.

### **2.3.1. Estructura de la Distribución**

#### 2.3.1.1. Funciones de los mercados centrales mayoristas

Los mercados mayoristas tienen 5 funciones importantes:

- Reunir los productos: Reúnen una gran variedad de mercancías.
- Fijar los precios: Determinan los precios razonables mediante los negocios tales como “seri” (subasta) reflejando la relación de oferta y demanda.
- Distribuir las mercancías: Distribuyen las mercancías rápidamente a numerosos comerciantes de venta al por menor.
- Liquidar los negocios: Liquidan el importe de negocios rápida y seguramente.
- Prestar informaciones: Recogen y transmiten informaciones sobre la oferta y la demanda.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIALES

##### 3.1.1. Cepas

- *Listeria monocytogenes* ATCC 15313
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Rhodococcusequi* ATCC 6939

##### 3.1.2. Medios de cultivo/Preparación por componente

- Caldo: ONE Broth-Listeria Base CM1066 - OXOID.
- Suplemento: ONE Broth-Listeria Selective Supplement - OXOID.
- Agar: Agar base Listeria selective (Oxford formulation) CM0856 - OXOID.
- Suplemento: Listeria selective Supplement (Oxford formulation) - OXOID.
- Agar Columbia Sangre Base - OXOID
- Caldo Brain Heart Infusion (BHI) - BD
- Caldo TSB: Tryptone Soya Broth CM0129 - OXOID
- Agar Rojo Fenol Caseína Peptona – MERCK
- SIM. Medio de cultivo. MERCK
- Caldo Nitrato. OXOID.
- L(+)-Ramnosa monohidratada (27386), VWR.
- D-Xilosa (0181-13-6) DifcoLaboratories.
- D-Manitol (142067.1210), Panreac.
- Glucosa. MERCK
- Maltosa (0168-15) DifcoLaboratories.
- Esculina. MERCK
- Glicerina. Central Internacional.
- Sangre de carnero del Instituto Nacional de Salud.

### **3.1.3. Material Desechable**

- Bolsas de polietileno para toma de muestras.
- Placas Petri descartables. VWR MERCK. 10x100mm.
- Algodón.
- Guantes de látex.
- Mascarilla

### **3.1.4. Material de metal y de vidrio**

- Frascos SHOOT de 250 mL y 500 mL.
- Asas Drigalski estériles.
- Asas de siembra.
- Tubos de ensayo.
- Pilon y mortero estéril.
- Probetas 500 mL.
- Gradillas.
- Mechero.
- Porta y cubreobjetos.

### **3.1.5. Equipos**

- Micropipeta Transferpette de 0,5-10mL - BRAND.
- Micropipeta Transferpette de 100-1000mL - BRAND.
- Micropipeta de 5-50mL - BOECO Germany.
- Agitador: Mini Shaker - FISHER.
- Estufa 35°C: Autonics - TXN4M.
- Autoclave. FRAVILL
- Balanza. DENVER INSTRUMENT.
- Microscopio óptico. BAUSCH & LOMB.

### **3.1.6. Reactivos**

- Aceite de inmersión.
- Kit para Tinción de Gram.
- Alcohol medicinal 70°.

- Peróxido de hidrógeno al 3% (10 vol).
- Reactivo de Gries.
- Zinc pulverizado.

## **3.2. MÉTODOS**

### **3.2.1. Toma de Muestras**

Se tomaron 60 muestras de Salchicha tipo Huacho de los Mercados de Abastos del Cercado de Lima seleccionados aleatoriamente, de los cuales 12 muestras pertenecían al Mercado Central, 12 muestras al Mercado Aurora, 12 muestras al Mercado de Santa Rosa de Lima, 12 muestras al Mercado Elio y 12 muestras al Mercado San Idelfonso realizados desde Noviembre del 2011 a Abril del 2012. Estas 60 unidades de muestra se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en recipientes estériles, refrigerados y se procesaron dentro de las 24 horas de colectadas.

### **3.2.2. Homogeneización De La Muestra**

Bajo condiciones de esterilidad (uso de guantes, mascarilla, gorro y próximo a la llama del mechero bunsen), las muestras recolectadas se homogenizaron por trituración con un mortero estéril para proceder a su respectivo análisis microbiológico.

### **3.2.3. Análisis Microbiológico**

**3.2.3.1. Enriquecimiento Selectivo:** Se tomó 25 gramos de cada muestra luego se añadió 225 mL de Caldo de Enriquecimiento “ONE Broth-Listeria Base CM1066”, que contiene un suplemento selectivo “ONE Broth-Listeria Selective Supplement”. Posteriormente se incubaron las muestras durante 48 horas a 35°C

- 3.2.3.2. Aislamiento Selectivo:** Tras ser incubados por 48 horas, se sembró solo las muestras que dieron positivo (ennegrecimiento del medio) en agar Selectivo para *Listeria* “Agar base *Listeria* selective (Oxford formulation) CM0856”, que contiene un suplemento selectivo “*Listeria* selective Supplement (Oxford formulation)”, luego se incubó a 35°C, durante 48 horas. Pasado este tiempo, solo las colonias sospechosas, crecidas en el medio, se volvieron a sembrar en el mismo medio selectivo para su mejor observación macroscópica e identificación bioquímica
- 3.2.3.3. Conservación de cepas:** Las colonias sospechosas se sembraron en agar TSA durante 48 horas a 35°C. Luego de este tiempo, se sometieron a refrigeración para su respectivo análisis bioquímico.
- 3.2.3.4. Identificación bioquímica:** Se examinó a simple vista, apreciando el crecimiento de colonias oscuras con halo negro (hidrólisis de esculina) en la superficie. Se realizó la diferenciación bioquímica tomando como referencia el Manual de Bacteriología Analítica (Bacteriological Analytical Manual - BAM).
- 3.2.3.5. Morfología microscópica:** Se determinó a través de la tinción Gram.
- 3.2.3.6. Prueba de la catalasa:** Se realizó para comprobar la presencia de la enzima catalasa mediante la adición de peróxido de hidrógeno.
- 3.2.3.7. Uso de carbohidratos:** Se inoculó una azada tomada del vial a tubos que contenían Agar semisólido Rojo Fenol Caseína Peptona con 0,5% de los siguientes

azúcares: manitol, maltosa, ramnosa, glucosa, xilosa y esculina. Se incubó a 35°C por un periodo de 48 horas.

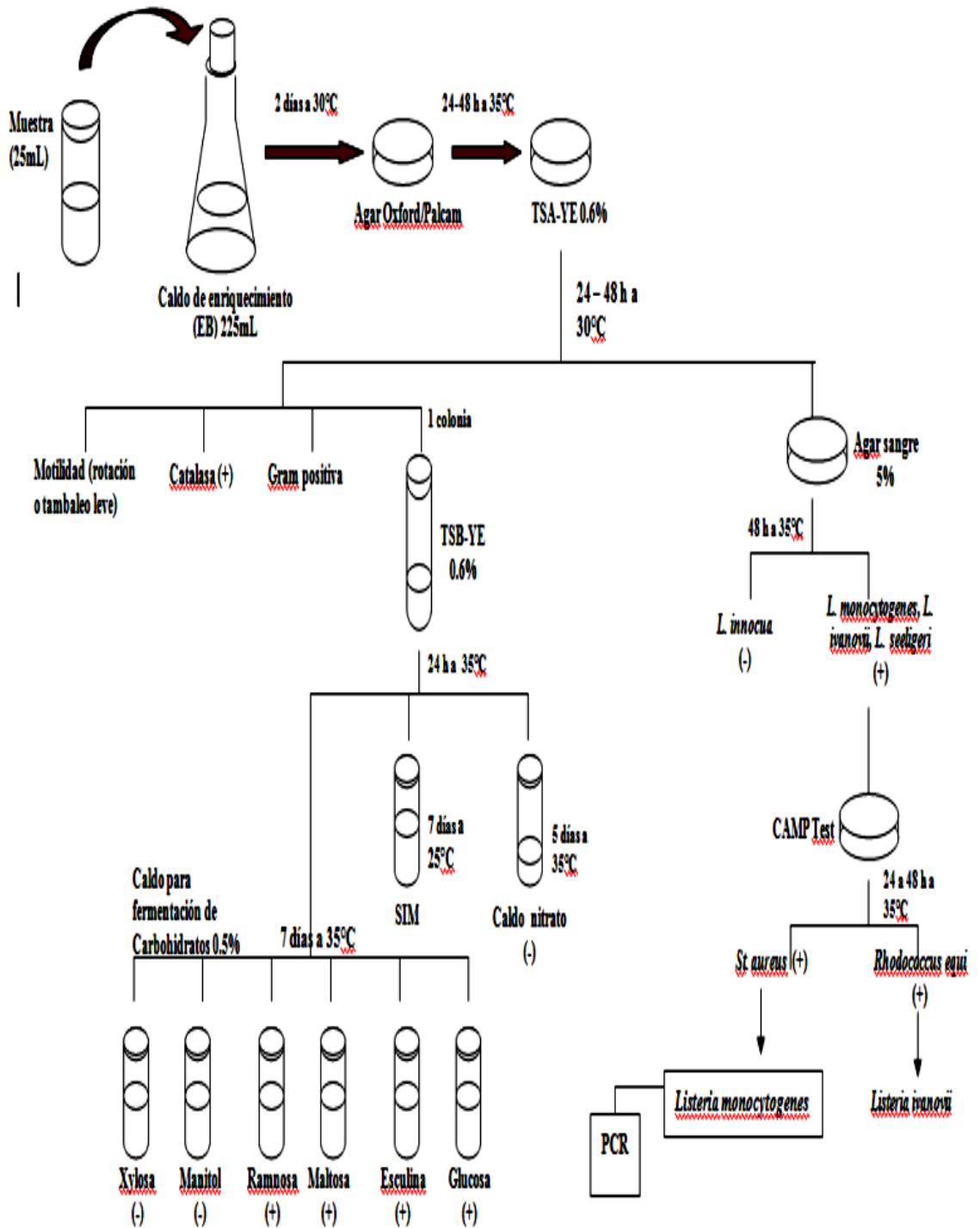
**3.2.3.8. Reducción de nitratos:** Se inoculó en caldo nitrato. Se incubó a 35°C por 5 días. Se adicionó el reactivo de Gries, después de 30 segundos al no observar desarrollo de color se agregó polvo de zinc. Se observó una coloración roja dando un resultado negativo.

**3.2.3.9. Movilidad:** Se sembró por puntura en el medio SIM e incubó a temperatura ambiente por 7 días, para luego apreciar la movilidad que se desarrolló dando la forma de un paraguas.

**3.2.3.10. Hemólisis:** A partir del agar selectivo OXFORD, se sembró en agar sangre de carnero al 5% y se incubó 48 horas a 35°C. Se observó la naturaleza de la hemólisis.

**3.2.3.11. Prueba del CAMP.-** (Reacción de Christie, Atkins Munch-Peterson) Se llevó a cabo sembrando por estría en una línea recta una cepa de *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -toxigénico sobre el agar sangre de carnero, paralelamente se sembró por estría una cepa de *Rhodococcus equi*, las cepas de prueba se sembraron en forma transversal a la estría de *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi* pero sin tocarlas, es decir con 1 o 2 mm. de separación. Las placas se incubaron por 24-48h a 35°C. Esta prueba nos permitió diferenciar las especies de *Listeria*.

**ESQUEMA N° 1: AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Listeria monocytogenes*. POR METODO MICROBIOLÓGICO**



#### IV. RESULTADOS

De las muestras analizadas procedentes de los mercados de abastos del Cercado Lima, repartidas en 5 mercados aleatoriamente, de ellos fueron tomadas 12 muestras de cada mercado, se logró aislar *Listeria monocytogenes* en Salchichas tipo Huacho expandidas en los mercados de Cercado de Lima. 47 muestras resultaron positivas para *Listeria Monocytogenes*.

De las 12 muestras procedentes del Mercados Central 10 resultaron positivas para *Listeria monocytogenes*, mientras que 02 fueron negativas.

De las 12 muestras procedentes del Mercado Aurora, las 12 muestras resultaron positivas para *Listeria monocytogenes*.

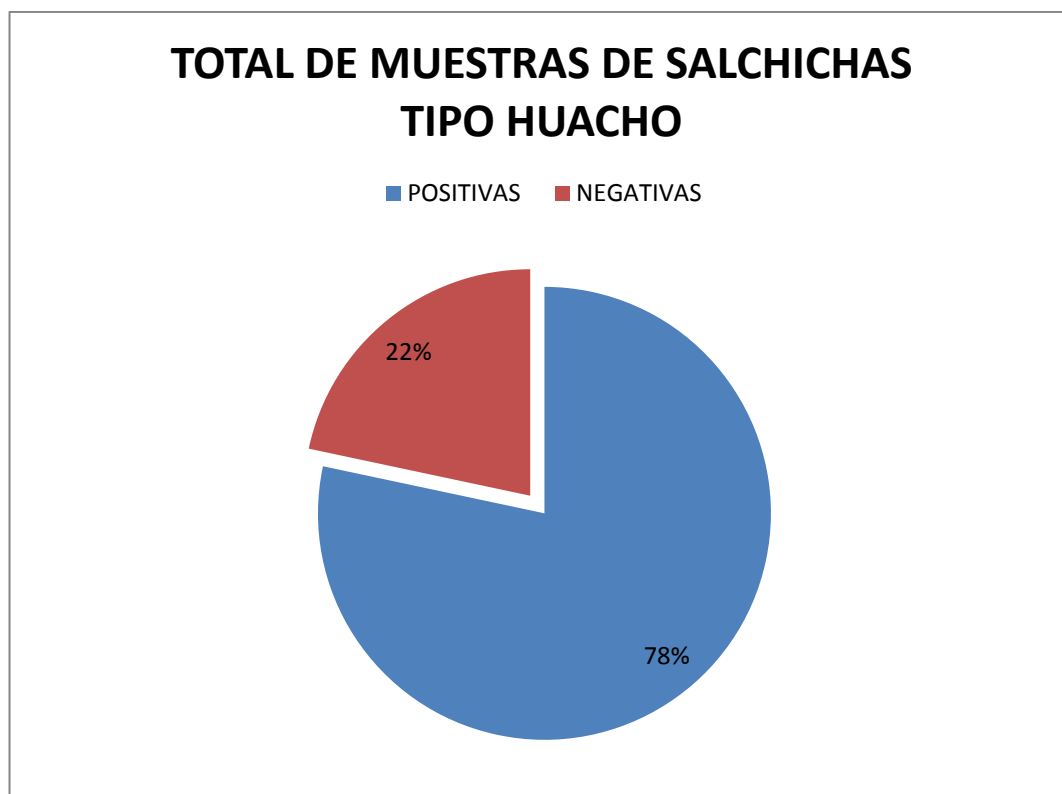
De las 12 muestras procedentes del Mercado Santa Rosa de Lima ,09 muestras salieron positivas para *Listeria monocytogenes.*, mientras que 03 resultaron negativas.

De las 12 muestras procedentes del Mercado Elio 09 muestras resultaron positivas para *Listeria monocitogenes*, en cambio 03 muestras fueron negativas.

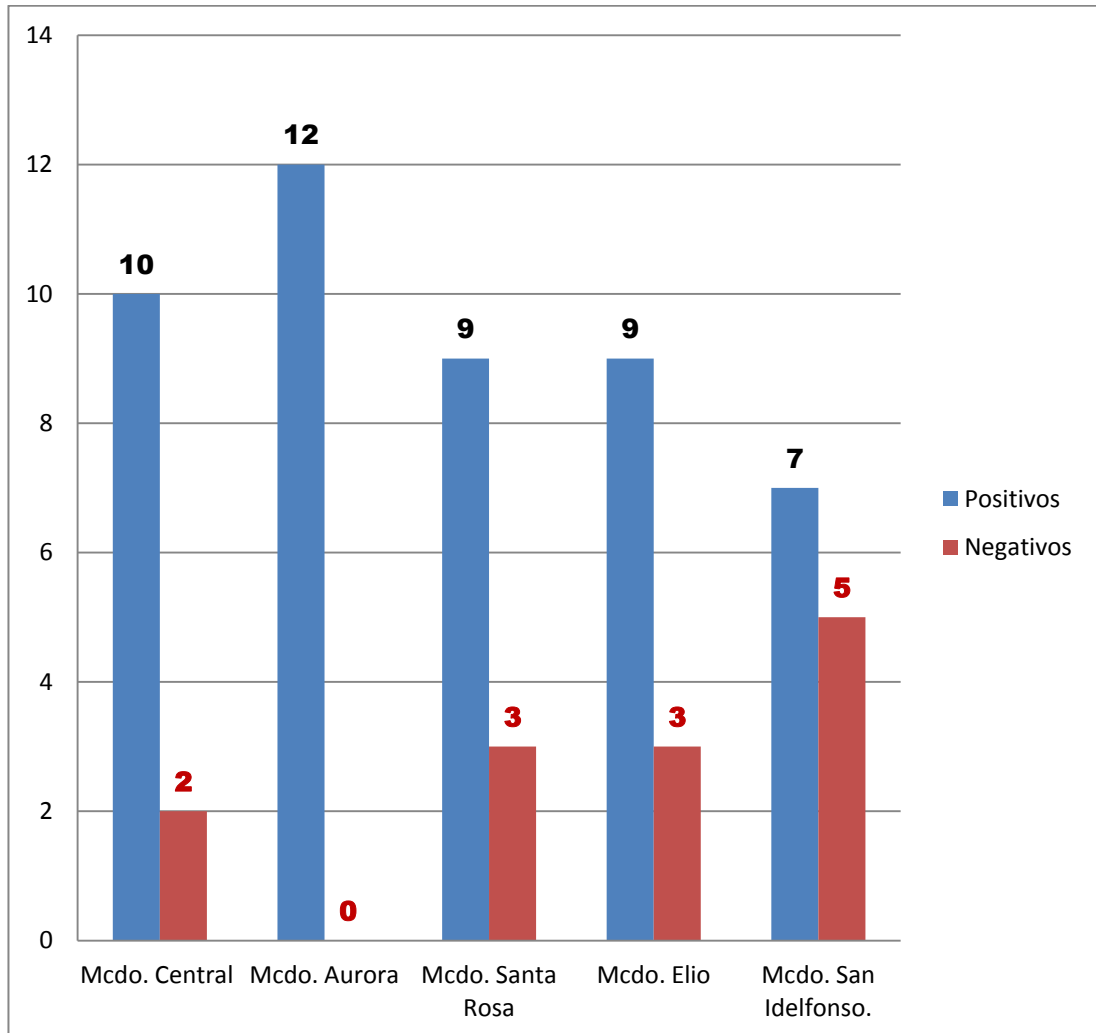
De las 12 muestras procedentes del Mercado San Idelfonso 07 muestras resultaron positivas y 05 muestras fueron negativas.

De las 60 muestras que proceden de los 05 mercados muestreados aleatoriamente del Cercado de Lima 47 resultaron positivas para *Listeria monocytogenes*.

**GRAFICO N°1**  
**NUMERO TOTAL DE MUESTRAS DE SALCHICHAS TIPO HUACHO QUE**  
**DIERON POSITIVO AL AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes*.**



**GRAFICO N ° 02:**  
**COMPARACION DE RESULTADOS POSITIVOS – NEGATIVOS PARA**  
***Listeria monocytogenes* EN SALCHICHA TIPO HUACHO.**



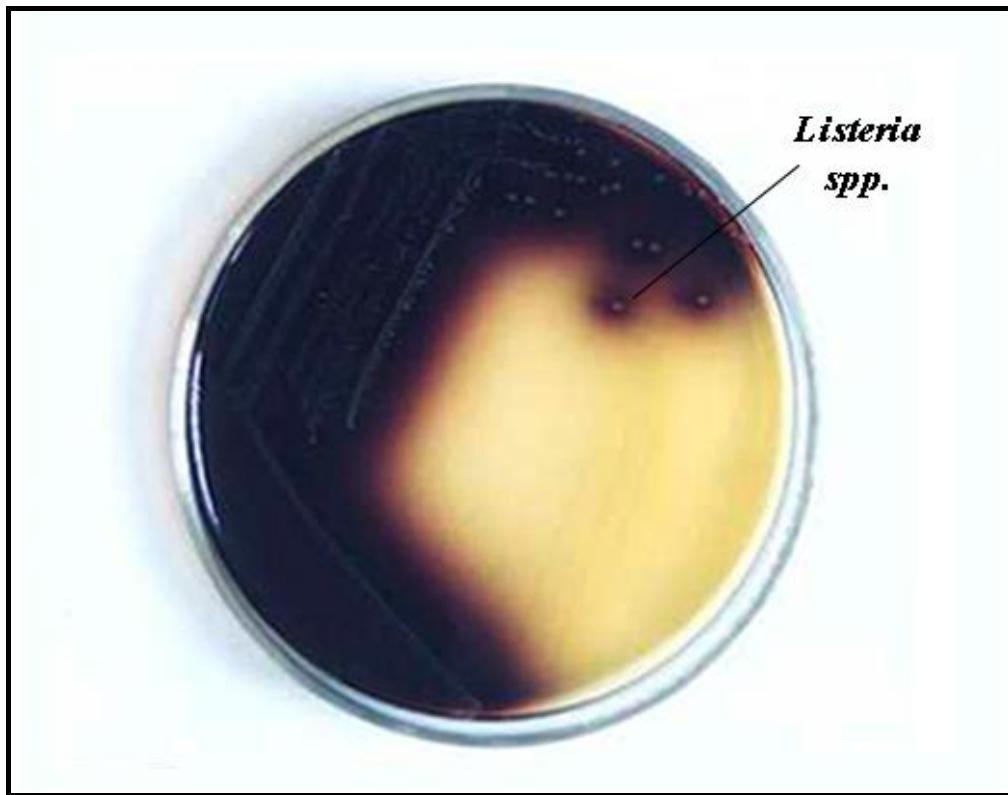
**Tabla N°3. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA DE CEPAS DE *Listeria* AISLADAS EN AGAR OXFORD**

Muestra	Procedencia	Agar	Coloración	Catalasa	Movilidad	Caldo	Hemólisis	Fermentación de Azúcares						CAMP
		Oxford	Gram			Nitrato		Xil.	Man.	Ram.	Mal.	Esc.	Glu.	
1	Mercado Central	(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
2		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
3		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
4		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
5		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
6		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
7		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
8		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
9		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
10		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
11		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
12		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
13	Mercado Aurora	(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
14		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
15		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
16		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
17		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
18		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
19		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
20		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
21		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
22		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
23		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
24		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>

Muestra	Procedencia	Agar	Coloración	Catalasa	Movilidad	Caldo	Hemólisis	Fermentación de Azúcares						CAMP	
		Oxford	Gram			Nitrato		Xil.	Man.	Ram.	Mal.	Esc.	Glu.		
25	Mercado Santa Rosa	(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
26		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
27		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
28		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
29		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
30		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
31		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
32		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
33		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
34		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
35		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
36		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
37		Mercado Elio	(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
38			(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
39	(+)		Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
40	(+)		Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
41	(-)		Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
42	(+)		Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
43	(-)		Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
44	(-)		Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	
45	(+)		Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
46	(+)		Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
47	(+)		Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	
48	(+)		Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>	

Muestra	Procedencia	Agar Oxford	Coloración Gram	Catalasa	Movilidad	Caldo Nitrato	Hemólisis	Fermentación de Azúcares						CAMP
								Xil.	Man.	Ram.	Mal.	Esc.	Glu.	
49	Mercado San Idelfonso	(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
50		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
51		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
52		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
53		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
54		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
55		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
56		(+)	Gram+	(+)	(-)	(-)	β	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	<i>L. monocytogenes</i>
57		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
58		(-)	Gram -	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
59		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>
60		(+)	Gram+	(+)	(+)	(-)	β	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	<i>L. monocytogenes</i>

## Colonias de *Listeria monocytogenes* en AGAR OXFORD



Después de 24 horas de incubación las colonias son de color gris azuladas, redondas de 1mm de diámetro, rodeadas por un halo negro. Después de 48 horas, se observan colonias con 2 a 3 mm de diámetro y un halo negro formando un cráter más oscuro en el centro. Este halo negro se produce debido a la hidrólisis de la esculina y a la formación del compuesto 6,7-hidroxicumarina que reacciona con los iones férrico que contiene el medio.

**Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en MEDIO SIM  
(Sulfuro-Indol-Movilidad)**



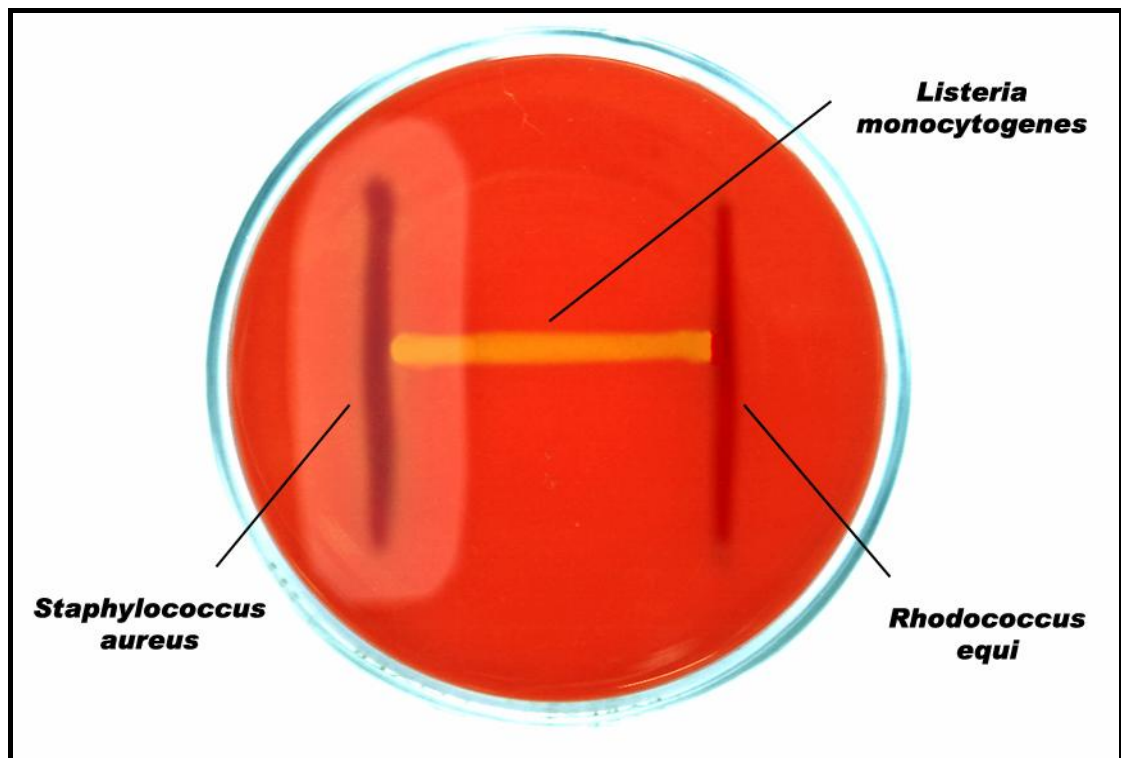
Se observa el crecimiento de la bacteria tipo paraguas de 3 a 5mm. La movilidad es más pronunciada a la T° ambiente que a 37°C y el cultivo móvil aparece como disco de crecimiento a unos 2mm x debajo de la superficie.

### Colonias de *Listeria monocytogenes* en AGAR SANGRE



Se observa en el agar sangre 5% de carnero, la  $\beta$ -hemólisis característica de *Listeria monocytogenes* como colonias pequeñas con un diámetro de 1 a 2 mm, translúcidas, blanco grisáceas.

## PRUEBA DE CAMP (CRHISTIE – ATKINS - MUNCH – PETERSON)



Se observa la hemólisis pronunciada de *Listeria monocytogenes* cerca de la zona de la toxina producida por *Staphylococcus aureus* a diferencia de la hemólisis producida cerca de la zona de la estría de *Rhodococcus equi*.

Se utilizaron las siguientes cepas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 19118, *Rhodococcusequi* ATCC 6939.

## V. DISCUSIÓN.

*Listeria monocytogenes* se encuentra ampliamente distribuida en alimentos sin procesar como leche, carne, vegetales y alimentos procesados como quesos suaves, helado, mantequilla, carne cruda, carne procesada, pescado crudo y ahumado en frío.

A pesar de encontrarse con frecuencia en alimentos crudos, los casos de listeriosis generalmente se relacionan con aquellos alimentos listos para el consumo, los que se conservan refrigerados por un periodo prolongado de tiempo o con los contaminados post procesamiento térmico según la FAO (2007), lo mencionado refuerza la necesidad de que las industrias procesadoras de estos alimentos establezcan barreras que minimicen su ingreso a los lugares de proceso, en particular, en aquellos puntos donde el alimento no es sometido a un tratamiento que permita la destrucción del patógeno.

Es por ello, que las industrias tienen, o deberían tener barreras sanitarias al ingreso de las salas de proceso, según R. Schöbitz (2009), este resultado es acorde con lo obtenido por A. Muñoz (2008).

La listeriosis, cuyo agente etiológico es *Listeria monocytogenes*, se sitúa entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia en la salud pública, debido al impacto social y económico que tiene por la gravedad de su cuadro clínico. La primera categoría corresponde a alimentos listos para el consumo que tienen un alto riesgo de asociarse con listeriosis debido a que facilitan el crecimiento de *L. monocytogenes*: leches, derivados lácteos con gran contenido de grasas, como quesos frescos, mantequillas, cremas, crustáceos cocidos, productos de mar crudos y ahumados, vegetales, frutas ácidas y otros .

En un trabajo realizado por Martino en el 2008, trabajo, de un total de 180 muestras determinó la incidencia de la *Listeria* en 54 muestras de quesos y 98 de embutidos y ahumados, comercializados en Cuba. Se aplicó un método tradicional para la detección cualitativa y cuantitativa de la *L. monocytogenes* según la Norma UNE-EN ISO 11290-1 (1997) y el Draft International Standard ISO/DIS 11290-2 (1995), además se realizaron pruebas bioquímicas adicionales para la identificación de otras especies de *Listeria*.

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

En los resultados del presente trabajo de investigación, de un total de 60 muestras de salchicha tipo Huacho resultó el 78% positivo para *Listeria monocytogenes*. El pH y las concentraciones de NaCl en los alimentos es un importante factor para la presencia de microorganismos como *L. monocytogenes*, según L. Villalobos y R. Martínez N. en el 2007, realizaron un estudio en quesos frescos comercializados en Cumana, Venezuela, obteniendo resultados para los parámetros de NaCl en quesos un mínimo de 0.58% y un máximo de 7.60% con una media de 2.08%, en cuanto a los valores pH, el valor mínimo observado fue de 5,23 y el máximo de 6,86 con una media de 5,97, considerados ligeramente ácidos; el grado de acidez y porcentaje de sal observados en las muestras fueron positivas para la detección del género de *Listeria*.

Sin embargo, los resultados hallados en el presente trabajo concuerdan con los encontrados en otros países (Hayes et al., 1992; Farber, 1993; Wenger et al., 1990; Schwartz et al., 1988 y Barnes et al., 1989). Un relevamiento realizado en fábricas de salchichas en distintos países Europeos, encontró *L. monocytogenes* en salchichas y en las plantas elaboradoras (Cox, 1993).

*L. monocytogenes* se encuentra en la materia prima como carne de cerdo y vacuno usados en la elaboración de salchichas y por lo tanto, en el ambiente de la planta elaboradora. La temperatura estándar de proceso para la fabricación de salchichas (71.0 °C) es suficiente para eliminar al microorganismo que contamina la materia prima; sin embargo, algunos autores sostienen que si el número inicial del microorganismo es elevado podría ocurrir que algunos sobrevivan (Zaika et al., 1990; Food Safety Update, 1989). Se ha demostrado que *Listeria* es 2 veces más resistente que *Salmonella* en carne que contiene cerca del 30 % de grasa, no así en carne con menos de 10 % donde las curvas de muerte térmica de *Listeria*, *Salmonella* y *Escherichia coli* parecen ser similares (Food Safety Update, 1989).

La presencia del microorganismo en la salchicha se debe a la contaminación post-proceso térmico y ocurre luego de que se pela hasta que se envasa, circunstancia favorecida por la ubicuidad del microorganismo. El almacenamiento a temperatura de refrigeración permite la multiplicación del microorganismo; esta característica lo diferencia de otros agentes patógenos que no ven favorecido su desarrollo a temperaturas de refrigeración.

La salchicha es un producto cocido que como tal no siempre se recalienta antes de consumirla y es frecuente que los niños la consuman en esas condiciones. Todavía se desconoce la dosis infectiva de este agente para el hombre. Es importante destacar, que si *L. monocytogenes* está presente en el alimento, aunque se desconozca en qué cantidad, representa un riesgo considerable -especialmente para personas que pertenecen a los grupos de riesgo, ya que es un microorganismo con considerable patogenicidad y alta tasa de mortalidad.

*L. monocytogenes* es un microorganismo emergente capaz de sobrevivir y además, desarrollar a temperaturas de refrigeración. Particularmente, por inoculación experimental, se demostró que la bacteria crece en salchichas

conservadas en refrigeración. La velocidad de crecimiento depende en gran medida del tipo de producto y del pH. El microorganismo generalmente crece bien en carnes cerca de pH 6 y pobremente en productos con valores de pH cercanos o por debajo de 5. Estos resultados indican la importancia de prevenir la contaminación post-proceso con *L. monocytogenes* en una variedad de alimentos listos para consumir o “ready to eat foods” ( Glass y Doyle, 1989).

En cuanto a las políticas adoptadas por distintos países acerca de los límites de tolerancia para *L. monocytogenes* en los alimentos, existen aún discrepancias, ya que no conoce la dosis infectiva y además porque el período de incubación es largo. No existe evidencia científica acerca de que 1, 10 o 100 UFC/g de *L. monocytogenes* sean niveles que no presenten riesgo para el consumidor. Recomendamos, sobre la base del actual conocimiento, que para aquellos alimentos que promueven el crecimiento del microorganismo, se aplique Tolerancia Cero, particularmente en los alimentos refrigerados listos para consumir de larga vida útil. Otra estrategia, es que se realicen cambios en el ambiente microbiológico mediante la introducción de obstáculos, ya sea por reducción del pH, aw o congelando los alimentos, se debe impedir que el microorganismo se pueda multiplicar. Los métodos para controlar *L. monocytogenes* deben incluir la implementación de sistemas que aseguren la calidad de los alimentos como el HACCP. En las plantas de alimentos, muchos de los problemas de contaminación del producto final con *L. monocytogenes*, se deben a contaminación post-proceso. El microorganismo debido a su gran ubicuidad se halla presente en el medio ambiente de procesamiento de alimentos. Tanto en las plantas de lácteos, carnes y productos de mar se deben redoblar los esfuerzos para intensificar y realizar correctamente las prácticas de higiene y desinfección. La combinación de la higiene, la desinfección, las BPF y el uso del HACCP, no posibilitará la eliminación del microorganismo del medio ambiente, pero si la reducción de la contaminación de los alimentos con *L. monocytogenes*.

Según Espinoza M; De La Torre B (2003), realizaron un estudio en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero – marzo, se evaluaron 74 muestras de queso fresco preparado artesanalmente; analizado según el método de la FDA, se logró aislar 28 colonias con características similares a las del género *Listeria*. Las pruebas confirmatorias evidenciaron que 6 (21,4%) presentaban características compatibles con *L. monocytogenes*. Asimismo, 22 (78,6%) correspondieron a otros microorganismos, de las cuales 6 (21,4%) se identificaron como *Lactococcus lactis lactis*, 14 (50%) como *Enterococcus spp.* y 2 (7,4%) como *Bacillus spp.* Finalmente, de 74 muestras de quesos frescos, tres (4,05%) fueron positivas para *L. monocytogenes* y correspondieron a los mercados Alejandro Toledo y Modelo, las muestras positivas para *L. monocytogenes* en dos mercados, de acuerdo con los criterios microbiológicos de calidad e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano, que se aplican para leche y derivados según DIGESA, donde el límite permisible por g/mL para *L. monocytogenes* es cero; muestran que existe riesgo para la salud, dado que la existencia de una sola bacteria en condiciones favorables para su reproducción, sumado a la motilidad que presenta a temperatura ambiente <sup>1,3,9,10,17,18</sup> puede contaminar a los quesos libres de esta bacteria *L. monocytogenes* se aisló en 4% del total de muestras de queso fresco tipo artesanal que corresponden a los mercados Alejandro Toledo y Modelo, encontrándose, en este último, la mayor cantidad de muestras positivas (8%), esto se debe a que los quesos son almacenados a temperaturas frescas, junto con otros alimentos como los embutidos, que pueden ocasionar una contaminación cruzada <sup>28,30</sup>; esto, sumado a la infraestructura que retiene humedad, hace posible la supervivencia de *Listeria*.

La ausencia de este microorganismo en quesos de los mercados Santo Domingo y San Antonio, cumple con las normas legales emitidas por la Dirección General de Salud (DIGESA) en cuanto a la tolerancia cero para *L. monocytogenes* por gramo de alimento; sin embargo, presentaron mala

calidad higiénico-sanitaria, porque en estos se encontró alta carga de microorganismos indicadores de contaminación fecal como *Enterococcus spp.*, también *Lactococcus lactis*, *Lactis* y *Bacillus spp.*, que como anteriormente se mencionó ejercen efectos antagónicos para *L. monocytogenes*. Otro factor que pudo haber influido es que muchos de estos quesos se expenden al aire libre en forma ambulatoria, expuestos a la irradiación solar casi directa, lo cual ocasiona la pérdida de humedad y el endurecimiento del producto; condición donde la probabilidad de encontrar este microorganismo es nula (26). El bajo porcentaje hallado de este microorganismo no deja de ser un riesgo para la salud, dado que la existencia de una sola bacteria en condiciones favorables para su reproducción, sumado a la motilidad que presenta a temperatura ambiente <sup>2, 5, 6, 11, 18,31</sup>, puede contaminar a los productos vecinos. Por lo tanto, en el mercado Modelo existe un riesgo potencial para la salud de la población consumidora.

En el presente trabajo de, Rodríguez y Schobitz. (2009). Realizó una técnica de conservación para salmón ahumado, que consiste en un concentrado de proteína de suero lácteo (CPS) posee propiedades funcionales apropiadas para la elaboración de películas biopreservantes, siendo factible la incorporación de bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de sustancias tipo bacteriocina (STB) y así, lograr un efecto controlador sobre *Listeria monocytogenes* al ser utilizada como cobertura sobre salmón ahumado. Las condiciones para la formación de la película fueron: CPS 12% p/v, glicerol 18% v/v, pH en solución formadora de película 7,0 y 8,0, y secado a 30°C por 16 horas. La actividad inhibitoria de la película incorporada con las cepas lácticas fue evaluada usando el método de difusión frente a un césped de *L. monocytogenes* y mediante el recuento en placa, obteniendo: la combinación de dos cepas BAL aumentó la actividad controladora sobre *L. monocytogenes* logrando reducir hasta 2,1 ciclos logarítmicos el crecimiento de este patógeno, bajo condiciones de refrigeración durante 15 días.

## VI. CONCLUSIONES

1. La incidencia de *Listeria monocytogenes* en las Salchichas tipo Huacho procedentes de los Mercados de Abastos del Cercado de Lima es de 78%.
2. Las cepas de *Listeria monocytogenes* se identificaron mediante las pruebas bacteriológicas convencionales, tales como la presencia de B-hemolisis, Reacción de CAMP positiva y Pruebas bioquímicas tales como D-xilosa, D- manitol, L- ramnosa, D- maltosa, Esculina y D- glucosa.
3. En el Mercado Central el 84% de las muestras, presento *Listeria monocytogenes*, el Mercado Aurora el 100%, el Mercado Santa Rosa el 75%, el Mercado Elio el 75% y el Mercado San Idelfonso el 58%.
4. Los resultados indican que las Salchichas tipo Huacho son vehículos de transmisión *Listeria monocytogenes*, convirtiéndose en potenciales alimentos de alto riesgo; que deben ser vigilados y controlados por la autoridad competente.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acha PN, Szyfres B. Organización Panamericana de la Salud. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*. 3ra Edición. Vol. I (Publicación científica N°580). Washington D.C. OPS. 2001.pp 186-197.
2. Barza M. Listeriosis and milk. *The New England Journal of Medicine*.1985; 312 (7): 438-440.
3. Bell O, Kyriakides A. Listeria. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza.2000.
4. Brackett R. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Tech*. 1988; 42 (4): 162-164.
5. Doyle ME. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. [internet] Madison: FRI briefings; 2001 Oct. [Día de acceso: 13 p. Disponible en:<http://fri.wisc.edu/docs/pdf/virulencelmono.pdf>
6. Doyle MP, Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. *Food Tech*. 1988;42(4): 169-171.
7. El peruano. Normas Legales. Resolución Ministerial N° 615-2003-SAJDM. "Criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano". ( Lima, 28 de junio del 2003).
8. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev*. 1991 Sep; 55(3):476-511.
9. Farber JM, Coates E, Daley E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogones*. *LettApplMicrobiol*.1992;15(3): 103-105.

10. FDA-CFSAN USDA-FSIS. Structure and initial data survey for the risk assessment of the public health impact of foodborne *Listeria monocytogenes*. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/listrisk.html> (Día de acceso: 09/04/2001).
11. Gellin BG, Broome CV. Listeriosis. *JAMA*. 1989; 261(9):1313-1320.
12. Goebel W, Chakraborty T, Domann E, Köhler S, Kuhn M, Leimeister-Wächter M, Sokolovic Z, Wuenscher M. Studies on the pathogenicity of *Listeria monocytogenes*. *Infection*. 1991;19Suppl 4:S195-197.
13. Guevara JM, Pereda J, Roel S. Human listeriosis in Peru. *TropenmedParasitol*. 1979;30(1):59-61.
14. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods of the International Union of Microbiological Societies). *Microbiología de los alimentos. Características de los patógenos microbianos*. Editorial Acribia, Zaragoza. 1996. pp 165-209.
15. Jay JM. *Microbiología moderna de los alimentos*. Cuarta Edición. Editorial Acribia. Zaragoza. 2000. pp 457-480.
16. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. *Listeria y Erysipelothrix*. En *Microbiología de Zinsser*. 20a. Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires. 1997. pp 663-668.
17. Jones D, y Seeliger HPR. The Genus *Listeria*. En Balows A, Trúper HG. Dworkin M, Harder W, Scheleifer KH. *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. 2da edición, vol 1, Springer-Verlag, Nueva York. 1992. pp. 1595-1616
18. Jones D. Foodborne illness. Foodborne listeriosis. *The Lancet*. 1990;336: 1171-1174.
19. Kerr KG, Lacey RW. Listeriosis. En Watson D, *Revisiónes sobre Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Higiene y Seguridad Alimentaria*. Editorial Acribia. Zaragoza. 1994. pp 21-42.

20. Khan SA, Khalid SM, Siddiqui R. The effect of pH and temperature on haemolysin production by *Listeria species*. LettApplMicrobiol. 1993; 17:14-16.
21. Larson AE, Jhonson EA, Nelson JH. Survival of *Listeria monocytogenes* in comercial cheese brines. JDairy Sci.1999;82(9): 1860-1868
22. Marth EH. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. FoodTech.1988; 42(4): 165-168.
23. Pascual MR, Pascual V. *Microbiología Alimentaria. Metodología analítica para alimentos y Bebidas*. 2da Edición. Editorial Díaz de Santos. Madrid.1999.
24. Pascual MR. *Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentada*. Editorial Acribia. Zaragoza. 1994. pp. 117-121.
25. Rea MC, Cogan TM, Tobin S, y col. Incidence of pathogenic bacteria in raw milk in Ireland. J ApplMicrobiol.1992;73:331-336.
26. Rocourt J, Bille J. Foodborne listeriosis. World Health Stat Q.1997; 50(1-2):67-73.
27. Rocourt J, Cossart P. *Listeria monocytogenes*. En Doyle MP, Beuchat LP, Monteville TJ. *Microbiología de los Alimentos, Fundamentos y fronteras*. Editorial Acribia, Zaragoza. 2001. pp 355—369.
28. Rouquette C, Berche P. The pathogenesis of infection by *Listeria monocytogenes*. Microbiologia. 1996;12(2):245-258.
29. Schlech III WF, Schlech WF 3rd, Lavigne PM, Bortolussi RA, Allen AC, Haldane EV, Wort AJ, Hightower AW, Johnson SE, King SH, Nicholls ES, Broome CV. Epidemic listeriosis--evidence for transmission by food. N Engl J Med. 1983;308(4):203-206.
30. Schlech WF 3rd. Expanding the horizons of foodborne listeriosis. JAMA. 1992;267(15):2081-2082.
31. Schlech III WF. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. Food Tech. 1988;42(4):176-178.

32. Schuchat A, Deaver KA, Wenger JD, y col. Role of foods in sporadic listeriosis. I case-control study of dietary risk factors. *JAMA*. 1992;267(15): 2041-2045.
33. Seeliger HPR, Jones D. Genus *Listeria* En: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, and Holt JG. Eds. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th edn, vol 2*: Baltimore: Williams & Wilkins. 1986. pp. 1235 — 1245.
34. Silliker JH. *Listeria monocytogenes*. *Food Tech*. 1986; 40(8):24.
35. Tappero JW, Schuchat A, Deaver KA, Mascota L. and Wenger J. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? *JAMA*. 1995; 273(14):1118-1122.
36. Tilney LG and Tilney MS. The wily ways of a parasite: induction of actin assembly by *Listeria*. *Trends Microbiol*. 1993; 1(1):25-31.
37. Valencia ME, Crego A, Laguna F, Ortega G, Gonzáles JM. Listeriosis: una infección poco frecuente en pacientes con VIH. *Anales de Medicina Interna*. 2000;17(12):649-651
38. Watkins J, y Sleath KP. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *J Appl Bacteriol*. 1981; 50:1-9.
39. Weis J, y Seeliger HPR. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiol*. 1975; 30(1): 29-32.
40. Vera H., Ferro, C., Triana, L. Prevalencia de *listeria monocytogenes* en derivados carnicos cocidos para directo consumo. [Trabajo /experiencia]. Bogota: Laboratorio De Salud Pública de la Secretaría Distrital de Salud de Bogotá D.C.; 2004.
41. Martino T, Leyva V, Pérez, A, de los Reyes, Suarez F, Lara C. Determinación de *Listeria spp.* en quesos y embutidos comercializados en cuba. *Rev. Cubana Salud Pública*. 2005; 31(3):217-222.
42. Crespo M, Vélez J, Castañeda C, Hoyos F, Ligia M, Salazar J. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. *Colombia Med*. 1999; 30: 89-98.

43. Espinoza A, De la Torre M, Salinas M, Sánchez V. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados de los distritos de Ica, Enero-Marzo 2003. Rev Per MedExp Salud Pública 2004; 21: 71-75.
44. Alcázar C, Rubio F, Alonso R. Detección de *Salmonella spp* y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México. VetMexico. 2006; 37(4):417-429.
45. Cantú R, Avila S, Sierra G, Cruz W, Rivera G, Bocanegra V. Detección de *listeria sp* y *listeria monocytogenes* en muestras de pollo crudo y de cuerpos de agua de la región mediante PCR. Bioquímica. 2007; 32 (A):115.
46. Molina S, Mercado M, Carrascal A. Efecto de tiempo y temperatura de cocción en chorizos inoculados artificialmente con *listeriamonocytogenes*. UnivSci. 2009;14(2-3):198-205.
47. Calvacante A, Teixeira E, Frizzo S, Souza M, Montenegro T. *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. Ciênc. Saúde Coletiva. 2011; 16(2): 657-662.
48. Schuchat A, Deaver K, Hayes PS. Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. J Infect Dis. 1993;167:1261-1262.
49. Schuchat A, Deaver KA, Wenger JD, y col. Role of foods in sporadic listeriosis. I case-control study of dietary risk factors. JAMA. 1992;267(15): 2041-2045.
50. Seeliger, HPR y Jones D. Genus *Listeria* Pirie 1940, 383AL. En: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, and Holt JG. eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th edn, vol 2: Williams & Wilkins, Baltimore. 1986, pp. 1235 – 1245.
51. Tappero JW, Schuchat A, Deaver KA, Mascola L and Wenger J. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States. Effectiveness of prevention efforts? JAMA. 1995; 273(14):1118-1122.

52. Tilney LG and Tilney MS. The wily ways of a parasite: induction of actin assembly by *Listeria*. *Trends in Microbiology*. 1993; 1(1):25-31.
53. Unnerstad, H. *Listeria monocytogenes* – Strain diversity demonstrated by genotyping. Doctoral Thesis, 2001. ISSN 1401- 6257 ISBN 576-5919-2. <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00000026/pdf>. (Día de acceso: 05/05/2003)
54. Valencia ME, Crego A, Laguna F, Ortega G, Gonzáles JM. Listeriosis: una infección poco frecuente en pacientes con VIH. *Anales de Medicina Interna*. 2000;17(12).
55. Villanueva E. *Listeria monocytogenes* en Quesos frescos de 5 mercados de expendio en Lima. [Tesis pregrado]. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima - Perú. 2000.
56. Watkins J, y Sleath KP. Isolation and enumeration of *Listeria monocytogenes* from sewage, sewage sludge and river water. *Journal of Applied Bacteriology*. 1981;50:1-9.
57. Weis J, y Seeliger HPR. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Applied Microbiology*. 1975;30(1):29-32.
58. Zavaleta A, Martinez AJ, Rodríguez F. Intraspecific genetic diversity of *Oenococcus oeni* as derived from DNA fingerprinting and sequence analyses. *Appl Environ Microbiol*. 1997;63(4):1261-1267.