

**Universidad ORT Uruguay
Facultad de Ingeniería**

**Desarrollo de un nuevo producto para la
detección presuntiva de *Listeria*
monocytogenes en un solo paso mediante
microbiología clásica**

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera
en Biotecnología

Sofía Vaz Suarez - 213657

**Tutora: Laura Maccio
2022**

DECLARACION DE AUTORIA

Yo, Sofia Vaz declaro que el trabajo que se presenta en esta obra es de mi propia mano.

Pudiendo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Trabajo Final de Carrera;
- Cuando he consultado el trabajo realizado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo que fue realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente que fue contribuido por otros, y que fue contribuido por mi;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.



Sofía Vaz
10 de Agosto de 2022

RESUMEN

Listeria monocytogenes es una bacteria causante de la listeriosis, la enfermedad de transmisión alimentaria con mayor tasa de mortalidad a nivel mundial. En la actualidad el número de casos registrados de listeriosis se encuentra en aumento, por lo cual las regulaciones para prevenir su presencia en los alimentos son cada vez más estrictas. Siendo necesario que todos los alimentos que se comercialicen sean seguros y se encuentren dentro de las normativas.

De esta manera, se detectó que un punto importante en la prevención de la contaminación alimentaria, se encuentra en mantener la inocuidad del alimento durante toda la cadena productiva. Incluso en las etapas post producción, ya que no cuentan con pasos bactericidas. Esto es especialmente clave en el caso de los alimentos listos para el consumo, al no pasar por una etapa de cocción previo a ser ingeridos.

Es aquí, donde entra el monitoreo ambiental de las plantas productoras de alimentos. Lo que se busca con estos, es tener un control de todas las superficies del establecimiento (tengan o no contacto directo con los alimentos) y mediante estos análisis ambientales detectar la presencia de *L. monocytogenes*. Los cuales para ser efectivos deben ser seguidos de medidas correctivas.

En este contexto el objetivo de este proyecto fue generar un nuevo producto capaz de detectar *L. monocytogenes* en distintas superficies que se puedan encontrar en la industria alimentaria. Como pueden ser las mesadas, heladeras y piletas, entre otras. Lo cual se llevó a cabo mediante la aplicación de técnicas de microbiología clásica.

Se logró desarrollar un producto de fácil manipulación que permite detectar la presencia de *L. monocytogenes* en superficies. Pudiendo ser aplicado en establecimientos alimentarios, para el monitoreo ambiental como medida preventiva y así evitar la contaminación de los alimentos.

PALABRAS CLAVE

Caldo de cultivo, *Listeria monocytogenes*, *Listeria spp.*, producir, inocular, incubar, sembrar, estriar, componente.

ABREVIATURAS

ACL: AGAR CROMOGÉNICO *Listeria*

ALC: ALIMENTO LISTO PARA EL CONSUMO

BHI: INFUSIÓN CEREBRO CORAZÓN

BLEB: CALDO DE ENRIQUECIMIENTO PARA *Listeria* TAMPONADO

CA: CALDO A

CSA: CALDO SA

CF: CALDO F

CD: CALDO D

CDR: CALDO DR

CRF: CALDO RF

C2F: CALDO 2F

ETA: ENFERMEDAD DE TRANSMISIÓN ALIMENTARIA

PCR: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

TPC: TEST DE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO

TSA: AGAR TRIPTONA DE SOJA

TSB: CALDO TRIPTONA DE SOJA

TSA/YE: AGAR TRIPTONA DE SOJA EXTRACTO DE LEVADURA

UFC: UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

ÍNDICE

1. Introducción	9
1.1. <i>Listeria</i>	9
1.1.1. Listeriosis	9
1.2. Problemática	9
1.3. Listeria en la industria	10
1.3.1. Contaminación de superficies en la industria alimentaria	11
1.4. Controles ambientales	12
1.5. Legislación alimentaria	12
1.6. Medios de cultivo microbiológicos	13
1.6.1. Clasificación de los medios de cultivo	13
1.6.2. Métodos de detección de <i>L. monocytogenes</i>	14
2. Objetivos	15
2.1. Objetivo general	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. Materiales y métodos	16
3.1. Cepas bacterianas	16
3.2. Generación de los inóculos bacterianos	16
3.3. Inoculación del caldo	17
3.4. Control de resultados	17
3.5. Producción de caldos de cultivo	17
3.6. Estudio de la selectividad	19
3.7. Estudio de la mínima concentración de <i>L. monocytogenes</i> detectable	19
3.8. Evaluación del caldo en muestreo ambiental sobre superficies en una avícola	19
3.9. Estudio de la estabilidad	19
4. Resultados y discusión	20
4.1. Control de inóculos	20
4.2. Evaluación de los caldos de cultivo desarrollados en este trabajo	21
4.2.1. Evaluación de la concentración del componente F	21
4.2.2. Evaluación de quitar el componente L	25
4.2.3. Evaluación de los componentes A, B, O Y P	26
4.3. Estudio de la selectividad	27
4.4. Mínima concentración de <i>L. monocytogenes</i> detectada por CF	28
4.5. Evaluación del caldo en muestreo ambiental sobre superficies en una avícola	29
4.6. Estudio de la estabilidad	31

5.	Análisis económico	33
5.1.	Análisis económico y situación del mercado uruguayo	33
5.2.	Inversión	33
5.3.	Validación económico financiera	35
5.3.1.	Mano de obra	35
5.3.2.	Materiales	36
5.4.	Fijación del precio de CF	37
6.	Conclusión y perspectivas a futuro	38
7.	Referencias bibliográficas	39
	ANEXO 1	43
	ANEXO 2	46

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LISTERIA

Listeria monocytogenes es una bacteria cocobacilar, que no forma esporas ni tampoco tiene cápsula. Es gram positiva, cuenta con un flagelo polar y es anaerobia facultativa. Se la puede encontrar ampliamente distribuida en diversos ambientes, como en la tierra, aguas, vegetales, alimentos y heces, tanto de personas como de animales. Tiene la capacidad de poder vivir en un gran rango de temperatura que oscila entre 1 y 45°C, también puede soportar concentraciones altas de cloruro de sodio y un rango de pH que va desde 4,5 a 9,2 (1, 2).

Para su detección en los laboratorios se llevan a cabo pruebas bioquímicas que se basan en sus características fisiológicas, como la hidrólisis de esculina o la β -hemólisis en agar sangre. También se la puede detectar según su movilidad, que es muy característica, ya que en medio semisólido se puede apreciar una forma de paraguas. Otras características de esta bacteria que permiten identificarla son que es oxidasa negativa, catalasa positiva y produce ácido a partir de xilosa y ramnosa. Esto último se utiliza para identificarla en medios con xilosa y ramnosa donde se puede ver que el medio vira de color (3, 4).

1.1.1. LISTERIOSIS

La listeriosis es la enfermedad causada por esta bacteria y es una de las ETA (enfermedad de transmisión alimentaria) que causa el mayor número de muertes al año, no por ser la más frecuente sino por tener un alto índice de mortalidad. Al ser un patógeno intracelular facultativo, pudiendo desarrollarse tanto dentro como fuera de las células, presenta una compleja patogenia. Es capaz de atravesar la placenta, las barreras intestinal y hematoencefálica, produciendo infecciones en fetos, meningoencefalitis y gastroenteritis (5, 6, 7).

La listeriosis se puede presentar como listeriosis invasiva (forma grave de la enfermedad) y no invasiva (forma leve de la enfermedad). Su forma no invasiva puede presentar síntomas como dolores musculares, fiebre, vómitos o diarrea, mientras que la forma invasiva se caracteriza por la presencia de *L. monocytogenes* en el líquido cefalorraquídeo, pudiendo producir encefalitis, convulsiones y alteraciones del estado mental como son los trastornos motores. En el 20% de los casos de mujeres embarazadas que contraen la forma invasiva de la enfermedad se produce muerte fetal, mientras que el 63% de los casos padecen infección neonatal. En los adultos con comorbilidades como pueden ser las enfermedades autoinmunes, se manifiesta como meningitis bacteriana y tiene una tasa de mortalidad del 20 al 40%. Para los grupos de riesgo la dosis infecciosa de *L. monocytogenes* es de alrededor de las 10^2 células viables y en el caso de las personas sanas es de 10^4 células viables. Sin embargo, aún no se ha logrado comprender en su totalidad la relación entre la dosis infectiva y la cepa bacteriana, por lo cual como medida preventiva se consideran a todas las cepas de *L. monocytogenes* como patogénicas (8, 9).

1.2. PROBLEMÁTICA

El mayor problema de la listeriosis es su alta tasa de mortalidad (20 - 30%), por lo que es considerada como la ETA más grave. Además, en la Unión Europea es la quinta infección zoonótica más frecuente. Actualmente, el número de casos ha sufrido un considerable aumento, estimándose que en los países desarrollados su frecuencia es de entre 2 y 15 casos cada un millón de habitantes. En 2017 hubo 2480 casos confirmados de listeriosis en la Unión Europea, mientras que esa cifra aumentó en 2018, confirmándose 2549 casos y una mortalidad del 15,6%. A su vez, en 2018 en Sudáfrica se reportó el brote más grande hasta la fecha de listeriosis, en el que se registraron 1000 casos y una tasa del 20%

de mortalidad. En 2011 se registró en Estados Unidos la mayor tasa de muertes a causa de una ETA, con 147 casos y 33 muertes (6, 10).

Se estima que el 90% de los pacientes con listeriosis requieren ser internados en cuidados intensivos. En Estados Unidos *L. monocytogenes* junto con otros tres patógenos causantes de ETAs representan un estimado de entre USD\$9 y USD\$11 billones al año en impactos a la salud humana (10).

La información disponible sobre la incidencia de listeriosis en América Latina es escasa, aunque al igual que en el resto del mundo está aumentando. Lo que va de la mano con la regulación de algunos países, por ejemplo en Brasil la listeriosis no es una enfermedad de notificación obligatoria y lo mismo ocurre en Ecuador, donde se desconoce su impacto en la población. Incluso en algunos países no se encuentran brotes reportados a pesar de que si se reportan muertes esporádicas o abortos causados por *L. monocytogenes*. Los motivos por los cuales se desconocen estos datos en los países subdesarrollados son la falta de un sistema de vigilancia y de control sanitario en los establecimientos productores de alimentos (11, 12, 13, 14).

A pesar de la poca prevalencia reportada de la enfermedad en estos países, se han realizado varios estudios que demuestran la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos producidos y vendidos en América Latina. En la mayoría de los casos se detectó la presencia de *Listeria* en quesos y productos lácteos elaborados en establecimientos rurales, donde se hacen como manera de minimizar el desperdicio de leche. También es importante mencionar que ocurre de igual manera para los productos cárnicos y alimentos provenientes de granja, donde la contaminación cruzada es el principal motivo de *Listeria* en los alimentos (12, 15).

En Uruguay, se registran brotes de ETAs desde 1993 y es obligatorio notificar los casos positivos de meningitis, es así como se realiza la vigilancia de las infecciones por *L. monocytogenes*. A pesar de que no ha habido brotes y la prevalencia de la enfermedad es de tres casos al año, estudios han demostrado la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos, principalmente aquellos listos para el consumo y congelados (16, 17).

1.3. LISTERIA EN LA INDUSTRIA

Este microorganismo significa una gran problemática para las industrias alimentarias por lo dificultoso que es su control en las plantas de procesamiento. En cuanto a la higiene y la salud alimentaria, *L. monocytogenes* cuenta con prioridad en los análisis de peligros y puntos de control críticos. El mayor inconveniente de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria es su capacidad de formar biofilms, ya que le permiten proliferar en los equipos de procesamiento. Teniendo en cuenta que además, le proporcionan protección contra los sanitizantes, siendo difíciles de eliminar mediante los métodos convencionales (9, 18, 19).

En las industrias alimentarias se puede encontrar *Listeria* frecuentemente en zonas húmedas, como son el suelo, las superficies de mesadas y lugares de trabajo, estanterías o utensilios. Especialmente, gracias a su habilidad de crecer a bajas temperaturas es muy probable encontrarla en las superficies de refrigeradores o dispositivos de refrigeración y ventilación, así como también en desagües y cañerías. Entre los factores que aumentan el riesgo de contaminación cruzada en las plantas procesadoras de alimentos, se destacan las prácticas ganaderas y agrícolas inadecuadas, el no seguir protocolos de controles preventivos, poca higiene en la cadena alimentaria, la ausencia de controles preventivos y la incorrecta aplicación de productos sanitizantes. Es importante mencionar que la mala higiene por parte del personal de la planta, especialmente de manos cumplen un rol importante en la contaminación cruzada de los alimentos (4, 20).

Hay evidencia de que la contaminación de los ALC (alimentos listos para el consumo), puede ocurrir luego de la producción, por ejemplo en el envasado o transporte, etapas donde no se cuenta con un paso bactericida. Por lo que es importante minimizar el riesgo de contaminación en todas las etapas incluyendo la postproducción. Este es el motivo por el cual la reglamentación implementada por la *Food and Drug Administration* (FDA), requiere que los establecimientos productores de ALC realicen controles ambientales de la presencia de *L. monocytogenes* a lo largo de toda la cadena productiva, de esta manera se busca reducir la posibilidad de contaminación en las plantas elaboradoras de alimentos (17, 21).

Teniendo en cuenta que, el aumento en la incidencia de *L. monocytogenes* ha obligado a los países desarrollados a establecer programas de monitoreo destinados a la protección alimentaria, es evidente pensar que la inocuidad es un punto de suma importancia en el comercio internacional. De tal manera, que es considerada como la insignia de calidad más valorada, motivo suficiente, para que los países en vías de desarrollo pongan énfasis en la inocuidad de sus alimentos. En muchos casos la economía de estos depende de la exportación de alimentos, viéndose obligados a mejorar la inocuidad de sus sistemas productivos (17).

Es preciso que se adecue la producción industrial a las exigencias de calidad e inocuidad requeridas por los países compradores, ya que estos son los que condicionan las exportaciones. En este contexto, los controles ambientales, como medida preventiva en la industria alimentaria son una herramienta rentable (17).

1.3.1. CONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Una de las causas por las cuales diferentes patógenos ingresan en los alimentos es mediante el contacto de esos alimentos con superficies contaminadas. Aunque, la limpieza de las superficies parece ser una solución obvia para evitar la contaminación, no es tan fácil como parece. Muchos microorganismos tienen la capacidad de formar biofilms, dificultando la eliminación de estos, como se mencionó previamente este también es el caso de *L. monocytogenes* (22, 23).

Los patógenos más comúnmente encontrados en las superficies de la industria alimentaria y que causan los mayores problemas sanitarios por lo cual son los más buscados son: *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Giardia lamblia*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* y *Yersinia enterocolitica* (24).

En las industrias alimentarias se pueden encontrar superficies de diversos materiales, que van desde metales, madera, plásticos, gomas, vidrio y hasta azulejos, entre otros. Diferentes estudios han demostrado que desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria algunos materiales, como el acero inoxidable, presentan mejores características higiénicas. Estos no le brindan a los patógenos un ambiente ideal para proliferar, además de que resisten limpiezas intensas. De todos modos, la posibilidad de encontrar patógenos en ellos sigue existiendo, aún más cuando no se siguen las medidas de higiene correctas. Sin embargo, el mayor problema de la industria alimentaria se encuentra en que aún hoy en día, muchos establecimientos no cuentan con la posibilidad de que sus equipos y superficies de trabajo sean de materiales adecuados, siendo este el caso de los establecimientos rurales en América Latina (14, 22).

Se debe tener en cuenta, que en muchas ocasiones los patógenos ingresan al ciclo productivo de un establecimiento en la superficie de las materias primas. Como es el caso de la cáscara de las frutas y las verduras que no han sido lavadas. Siendo estas un vehículo para la contaminación de las superficies de trabajo y las manos del personal. Al igual que ocurre con los materiales, algunas cáscaras le brindan a los patógenos un mejor nicho donde proliferar que otras (22, 24).

La manera más efectiva de evitar la contaminación cruzada en la industria alimentaria es asegurando la inocuidad de toda la materia prima que ingresa a la línea de producción. Por lo cual, el primer paso debe ser la sanitización de por ejemplo las frutas o los vegetales, donde la primera etapa del proceso debería ser el lavado. En cuanto a la limpieza de los establecimientos, no todos los microorganismos son susceptibles por igual a los mismos sanitizantes, ni a los mismos tiempos de exposición. Otro factor importante es que no todos los materiales pueden ser higienizados de la misma manera, ni con los mismos agentes sanitizantes (23, 24).

1.4. CONTROLES AMBIENTALES

Como se mencionó previamente el monitoreo ambiental es una herramienta que reduce la posibilidad de contaminación alimentaria. Funciona detectando a los patógenos, de manera que si es seguido de medidas correctivas se evita que entren en contacto con los alimentos. Se deben realizar en todas las etapas de la cadena productiva, especialmente en aquellas zonas de mayor potencial para la proliferación de microorganismos (24).

La retirada de alimentos (*recall*), además de ser un problema de salud pública, significa grandes pérdidas económicas para la industria y el comercio, porque genera una mala imagen y pérdida de confianza en las marcas. De esta manera es como los programas de control ambiental proveen beneficios económicos (21, 25).

En Uruguay se cuenta con un procedimiento específico para el monitoreo de *L. monocytogenes* en establecimientos industrializadores habilitados. Es una manera de mantener a las autoridades informadas, a la vez que permite al establecimiento tomar las medidas necesarias para eliminar o minimizar la posibilidad de contaminación (25, 26).

Para llevar a cabo un monitoreo ambiental se debe zonificar la planta procesadora en cuatro zonas. Siendo la primera, la que presenta el mayor riesgo de contaminación alimentaria, por ser aquellas superficies que tienen contacto directo con los alimentos. La cuarta y última zona, es la de menor riesgo, se refiere a las zonas que están por fuera de la sala del producto terminado, como los pasillos o el vestuario del personal. Los muestreos ambientales se suelen realizar con esponjas, escobillas o hisopos y la frecuencia de los mismos es mensual. Las muestras deben ser analizadas solamente en laboratorios habilitados (25, 26).

1.5. LEGISLACIÓN ALIMENTARIA

El Reglamento Bromatológico Nacional, dictamina que en los alimentos listos para el consumo debe haber ausencia del *L. monocytogenes* en 25 g de muestra y se especifica que para realizar el análisis se deben tomar cinco muestras del mismo alimento, empaquetado en su envase final. También se indica que además de los análisis ambientales, en los establecimientos se deben utilizar materias primas aptas para el consumo humano, como por ejemplo leche pasteurizada o agua potable, a las cuales a su vez se les deben realizar análisis microbiológicos (27).

La regulación es un poco diferente para la Unión Europea y Estados Unidos, puesto que son de los mercados más exigentes. En el caso de la Unión Europea, las regulaciones dependen de la matriz alimentaria. Permitiendo que haya hasta 100 UFC/g de *L. monocytogenes* a lo largo de toda la vida útil de un alimento, aunque aquellos ALC en los que pueda ser propicio que el patógeno proliferare debe haber ausencia en 25 g. Contrariamente, Estados Unidos exige la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g de alimento (28, 29).

1.6. MEDIOS DE CULTIVO MICROBIOLÓGICOS

El medio de cultivo es una preparación utilizada para el crecimiento, transporte y almacenamiento de microorganismos. El principal objetivo de los medios de cultivos es crear un ambiente adecuado para el crecimiento, simulando las condiciones lo más cercanas posibles a las naturales, asegurando el apropiado funcionamiento de la maquinaria enzimática de los microorganismos, lo cual implica un adecuado balance de los componentes. A pesar de que todos los microorganismos necesitan de macronutrientes y micronutrientes como lo son el carbono, nitrógeno, fósforo, sulfuros y minerales, la composición del medio dependerá de la especie que se trate de cultivar, ya que, los requerimientos nutricionales varían enormemente. Por lo cual, la selección y la concentración adecuada de los nutrientes es un factor de vital importancia. Los medios de cultivo son esenciales para el aislamiento e identificación de microorganismos en la industria alimenticia, farmacológica y cosmética, entre otras (30, 31).

1.6.1. CLASIFICACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Los medios de cultivo se pueden clasificar según varios parámetros, como son: su composición química, características físicas y tipo funcional entre otras (30, 32).

Dentro de la clasificación por composición química se encuentran los medios sintéticos o definidos, que son aquellos donde se conoce la composición exacta de cada componente. También, se encuentran los medios no definidos o complejos, que poseen ingredientes de composición química desconocida, como son las peptonas, extractos de carne o levadura y se utilizan para crecer microorganismos exigentes con requerimientos nutricionales complejos (30, 32, 33).

Las características físicas de los medios dependen de la concentración de agar que presenten, siendo los medios sólidos aquellos que cuentan con más del 1% de agar, semi sólidos los que cuentan con menos del 1% de agar y líquidos los que no contienen agar. En el caso de los medios líquidos también son llamados caldos de cultivo (32, 33).

Los medios también se pueden clasificar en diferenciales, enriquecidos y selectivos. Los medios diferenciales son los que permiten diferenciar e incluso identificar presuntivamente a los microorganismos, basándose en sus características biológicas. Los medios enriquecidos son aquellos que han sido fortificados con componentes que favorecen el crecimiento de microorganismos con requerimientos nutricionales complejos. Los medios selectivos son los que cuentan con componentes que favorecen el crecimiento de algunos microorganismos, inhibiendo el crecimiento de otros. Se conoce como medio no selectivo a los que promueven el crecimiento de varios microorganismos sin inhibir el de otros (30).

Los medios de cultivo pueden pertenecer a más de una clasificación a la vez, por ejemplo el medio MacConkey, es selectivo y diferencial. Este medio se utiliza para el crecimiento y selección de enterobacterias, a la vez que cuenta con componentes que inhiben el crecimiento de bacterias gram positivas. El medio Agar Triptona de Soja (TSA), es un medio sólido y no selectivo. Favorece el crecimiento de microorganismos no exigentes y moderadamente exigentes, por lo cual se utiliza para recuento en placa y mantenimiento de cultivos de referencia (30, 34, 35).

Además, según el método de preparación se pueden encontrar los medios listos para usar y los medios preparados a partir de formulaciones comerciales deshidratadas. Los medios listos para usar son sólidos o líquidos y se suministran en placas o tubos, listos para ser utilizados o para utilizarse luego de ser fundidos y enriquecidos. Mientras que, los medios de cultivo preparados a partir de formulaciones deshidratadas requieren ser rehidratados y procesados previos a su utilización. Además, pueden requerir ser suplementados. Es importante destacar que los medios de cultivo también pueden ser preparados en el laboratorio a partir de cada uno de sus componentes (32).

1.6.2. MÉTODOS DE DETECCIÓN DE *L. monocytogenes*

Actualmente, *L. monocytogenes* puede ser detectada mediante técnicas de microbiología clásica, como la utilización de caldos de cultivo, o mediante técnicas moleculares. Ambas técnicas presentan ventajas y desventajas, por lo cual la elección entre ellas depende de varios factores (36).

Dentro de las técnicas microbiológicas, la utilización de medios de cultivo selectivos y diferenciales, se acompaña con ensayos bioquímicos, donde se busca ver la presencia de un conjunto de características fenotípicas que sean exclusivas de *L. monocytogenes* llegando así a su identificación (3, 4, 36).

En cuanto a los medios utilizados para el crecimiento y detección de *L. monocytogenes*, se pueden encontrar el agar PALCAM (Anexo 1), un medio selectivo y diferencial, que permite su diferenciación y aislamiento. Otro ejemplo es el medio Agar Cromogénico (Anexo 1), el cual es selectivo y diferencial para su detección y cuantificación. Dentro de los caldos, uno de los más utilizados es el caldo Fraser, un medio enriquecido, selectivo y diferencial que permite el enriquecimiento selectivo de especies de *Listeria*, utilizándose para su rápida detección en muestras ambientales y de alimentos. En cambio, el caldo BLEB (caldo de enriquecimiento para *Listeria tamponado*) (Anexo 1) es enriquecido y selectivo pero no diferencial para *L. monocytogenes* (37, 38, 39, 40).

La técnica molecular más utilizada para la detección de *L. monocytogenes* es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La cual a pesar de tener un tiempo de procesamiento corto en comparación con las técnicas microbiológicas, cuenta con un precio elevado haciendo que no sea accesible para todos los laboratorios. Además, se requiere de equipamiento y materiales especiales que no suelen encontrarse en los laboratorios de microbiología. Se pueden encontrar varios kits de detección de *L. monocytogenes* que facilitan aún más su detección (40).

Otra manera de detectar *L. monocytogenes* es mediante técnicas que combinan la inmunología con la química, donde se utilizan productos de fácil y rápida manipulación como son las tiras reactivas, las cuales se pueden utilizar para la detección de *L. monocytogenes* tanto de superficies como de alimentos. A pesar de su fácil manipulación pueden presentar falsos negativos ya que, el límite de detección de estos no es alto (41,42).

Es en este contexto, que aparece la necesidad de un producto que permita la detección de *L. monocytogenes* de manera rápida y confiable con un bajo límite de detección. Es por esto, que el objetivo de este trabajo es lograr el desarrollo de un producto capaz de detectar de manera presuntiva *L. monocytogenes* mediante técnicas de microbiología clásica en superficies de la industria alimentaria.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un nuevo producto para la detección presuntiva de *Listeria monocytogenes* en un solo paso mediante microbiología clásica en las distintas superficies de la industria alimentaria.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para lograr el objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Diseñar y validar una fórmula que permita detectar *L. monocytogenes* en un solo paso en superficies.
- 2) Evaluar la viabilidad económico-financiera del nuevo producto.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseñaron formulaciones de caldos de cultivo para la detección presuntiva de *L. monocytogenes*, las cuales se basaron en los componentes de los caldos selectivos y diferenciales para *L. monocytogenes* ya existentes y en datos bibliográficos sobre componentes con potencial para ser utilizados en la detección de *L. monocytogenes*. Los caldos diseñados en este proyecto fueron evaluados para ver su eficacia al lograr la detección presuntiva en superficies de la bacteria mediante diferentes parámetros, como los límites de detección, la optimización de la concentración del componente F y la selección frente a otros patógenos. De manera que se fue cambiando la formulación de los caldos a medida que se obtenían los resultados y así logrando la formulación que mejor cumpliera con los objetivos planteados. Todos los ensayos fueron llevados a cabo en las instalaciones de ARAVANLABS (35, 36, 37, 38, 39, 43).

3.1. CEPAS BACTERIANAS

Listeria monocytogenes ATCC 7644, Lote 398-67-1, Microbiologics.

Staphylococcus aureus ATCC 6538, Lote 485-1092-1, Microbiologics.

Escherichia coli ATCC 25922, Lote 335-505-2, Microbiologics.

Listeria spp. aislada por personal del laboratorio de una muestra positiva de alimento.

3.2. GENERACIÓN DE LOS INÓCULOS BACTERIANOS

La obtención de los inóculos de *L. monocytogenes* se realizó siguiendo el protocolo de Test de promoción de crecimiento establecido por el laboratorio. El test de promoción de crecimiento se compone de varias etapas y tiene una duración de cuatro días. En el primer día se tomó un *pellet* liofilizado de una cepa bacteriana ATCC que se hidrató durante 15 minutos en caldo infusión cerebro corazón (BHI). Luego con un hisopo se estrió sobre una placa de medio TSA/YE (Agar Triptona de Soja/Extracto de levadura) y se incubó durante 24 horas a 36°C. En el segundo día se tomaron tres colonias bacterianas de la placa TSA/YE y se inoculó un tubo con TSB (Caldo Triptona de Soja), que se incubó 24 horas en estufa a 36°C. En el tercer día se realizaron diluciones seriadas (1/10) de ese tubo, el cual contenía 1×10^9 UFC/mL (según validación de la metodología empleada en Aravanlabs) hasta llegar a la concentración deseada. La concentración deseada varió a lo largo del trabajo, utilizándose inóculos de 10 UFC/mL, 1×10^2 UFC/mL, 1×10^3 y 1×10^4 UFC/mL de *L. monocytogenes*.

Los inóculos de *Listeria spp.* se obtuvieron mediante comparación con el estándar de MacFarland número 1, para realizar la suspensión bacteriana concentrar bacterias hasta conseguir la concentración deseada de 1×10^8 UFC/mL. En este caso se partió de un cultivo fresco de *Listeria spp.* en una placa de TSA (Agar Triptona de Soja). Se tomaron ansadas de ese cultivo y se resuspendieron en un tubo con TSB, a medida que se resuspendían las bacterias en el caldo se comparaba la turbidez del mismo con un tubo de referencia de MacFarland (correspondiente a la concentración deseada). Una vez obtenido el inóculo con 1×10^8 UFC/mL se realizaron diluciones seriadas hasta llegar a concentraciones de 10 UFC/mL, 1×10^2 UFC/mL, 1×10^3 UFC/mL y 1×10^4 UFC/mL.

Los inóculos de *E. coli* y *S. aureus* que se utilizaron fueron producidos siguiendo el protocolo de Test de promoción de crecimiento, establecido por el laboratorio. Se produjeron inóculos de las concentraciones 10 UFC/mL, 1×10^2 UFC/mL, 1×10^3 y 1×10^4 UFC/mL.

En cada caso para verificar si la concentración bacteriana de los inóculos era la deseada, se sembró 0,1 mL de cada inóculo en placas de TSA y se los incubó a 36°C. Pasadas las 24 horas de incubación

se procedió a hacer recuento en placa de cada una. Se tuvo en cuenta que se sembró 0,1 mL en la placa y el factor de dilución del inóculo.

3.3. INOCULACIÓN DEL CALDO

Para inocular los caldos producidos en este trabajo, primero se los fraccionó en tubos transparentes y se los inoculó de manera de mantener una relación de 1/100 (9,9 mL de caldo y 0,1 mL de inóculo). Previo a la inoculación, los inóculos eran vortexeados durante 15 segundos a velocidad media. Una vez inoculados se los incubó en estufa a 36°C durante 72 horas, todos los tubos fueron observados cada 24 horas en busca de cambios en la turbidez, coloración, aparición de *pellet* o precipitado.

3.4. CONTROL DE RESULTADOS

Para evaluar que cada caldo fue correctamente inoculado, luego de 48 horas de la inoculación con bacterias, se estirió una ansada de cada tubo en placas de TSA, de manera que creciera todo microorganismo presente en el caldo y se observaran posibles contaminaciones (evitando falsos positivos). A su vez, se estiraron placas PALCAM para asegurar que efectivamente los tubos fueron correctamente inoculados con *L. monocytogenes* o con *Listeria spp.*

3.5. PRODUCCIÓN DE CALDOS DE CULTIVO

Para la producción de los distintos caldos de cultivo que se desarrollaron y estudiaron en este trabajo, se partió de un caldo base cuya formulación se muestra en la Tabla 1 y se denominó CF, de este caldo se hicieron cuatro variantes, que se denominaron CDR, CD, CRF y C2F, que se diferenciaban entre sí por la presencia de los componentes Z, CT, D y R en su formulación. La formulación de estas se muestra en la Tabla 2 y fueron inoculados con 0,1 mL de inóculo conteniendo 1×10^3 UFC/mL de *L. monocytogenes*.

Tabla 1. Fórmula "base" de todas las variantes producidas en este proyecto (Caldo CF).

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
Componente A	0,4
Componente B	0,01
Componente O	0,01
Componente P	0,008
Componente L	3,0
Componente G	17,0
Componente H	3,0
Componente I	6,0
Componente J	9,6
Componente K	1,35
Componente M	5,0
Componente N	1,5
Componente T	0,04

Componente F	2,0
--------------	-----

Además, estas variantes (CD, CDR, CRF y C2F) incluyendo a CF, se probaron con cuatro concentraciones del componente F, 0 g/L, 1 g/L, 2 g/L y 4 g/L, las cuales se seleccionaron teniendo en cuenta concentraciones menores y mayores a las reportadas en bibliografía. Teniéndose así CF0 el cual contaba con 0 g/L del componente F, CF1 contaba con 1 g/L del componente F, CF2 contaba con 2 g/L del componente F y CF4 contaba con 4 g/L del componente F. Esta misma numeración se agregó a las otras variantes, en la Tabla 16 del Anexo 2 se encuentran todas las variantes de los caldos con su concentración correspondiente del componente F.

Tabla 2. Componentes diferenciales de las variantes CD, CRF, CDR y C2F.

CD	CRF	CDR	C2F
D	-	D	-
-	R	R	-
-	-	-	Z
-	-	-	CT

Z: Componente "Z"; CT: Componente "CT"; D: Componente "D"; R: Componente "R".

Según los resultados obtenidos luego de la inoculación de los caldos CF, CD, CRF, CDR y C2F con *L. monocytogenes*, se decidió descartar la variante CD y CDR, por lo cual se continuó trabajando con CF, CRF y C2F. Posteriormente, se decidió quitar el compuesto L de la formulación, ya que, puede tener un efecto inhibitorio sobre *L. monocytogenes*. La decisión se tomó en base a datos bibliográficos y a que el medio contaba con otros agentes inhibidores (44). Estas variantes fueron fraccionadas en tubos con 9,9 mL de cada una e inoculadas por separado con 0,1 mL de inóculo de las siguientes concentraciones bacterianas: inóculos de *L. monocytogenes* con 10 UFC/mL, 1×10^2 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL, de *Listeria spp.* 1×10^2 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL o de *S. aureus* con 1×10^2 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL.

Luego de evaluar estas tres variantes de caldos, se las descartó y se continuó solamente con CF ya que el cambio en su coloración fue más visible que en el resto de las formulaciones, del cual se produjeron dos nuevas variantes que se denominaron CA y CSA. En la formulación de CA se quitó el componente A y en la formulación de CSA se quitaron los componentes A, P, O y B. Ambas variantes y CF fueron inoculadas por separado, nuevamente con 0,1 mL de *L. monocytogenes* (concentración de inóculo: 1×10^2 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL), *Listeria spp.* (concentración de inóculo: 1×10^2 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL), *S. aureus* (concentración de inóculo: 1×10^2 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL) y *E. coli* (concentración de inóculo: 1×10^2 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL).

Finalmente, teniendo en cuenta los resultados obtenidos se optó por continuar trabajando con CF sin modificar su formulación. Por un lado, se volvió a inocular CF con 1 UFC/mL, 10 UFC/mL, 1×10^2 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL de *L. monocytogenes* en tubos independientes (concentración final en el tubo). Además, se inoculó caldo de manera de tener una concentración bacteriana final de 10 UFC/mL de *L. monocytogenes* y 10 UFC/mL de *S. aureus* en el mismo tubo y de 1×10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes* y 1×10^2 UFC/mL de *S. aureus* en el mismo tubo.

La producción de cada una de las variantes de los caldos de cultivo estudiadas en este proyecto se realizó en dos etapas. En una primera instancia se pesaron los componentes autoclavables en balanza analítica, se midió el volumen de agua destilada con una probeta y luego de disolver los componentes en el agua en frascos de vidrio se midió el pH. Teniendo en cuenta el pH ideal para el crecimiento de

L. monocytogenes se fijó que el pH de los caldos debería ser $7,2 \pm 2,0$ (1). Los frascos de vidrio conteniendo el caldo fueron autoclavados a 121°C durante 15 minutos. Al día siguiente, se pesaron en balanza analítica los componentes filtrables, los cuales fueron filtrados con un filtro de jeringa de 0,45 micras y agregados en los frascos de vidrio conteniendo la preparación previa. Este procedimiento se realizó en cabina de flujo laminar. El caldo luego se almacenó en heladera (entre 2 y 14°C) hasta su posterior uso.

3.6. ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD

De manera de evaluar la selectividad de las variantes de caldos desarrollados en este proyecto (CF, C2F y CRF), se inocularon tubos conteniendo estos caldos con diferentes concentraciones de *L. monocytogenes* (10 UFC/mL, 1×10^2 UFC/mL, 1×10^3 UFC/mL), *Listeria spp.* (1×10^2 UFC/mL, 1×10^3 UFC/mL), *S. aureus* (1×10^2 UFC/mL, 1×10^3 UFC/mL) y *E. coli* (1×10^2 UFC/mL, 1×10^3 UFC/mL). Todos los tubos se incubaron en estufa a 36°C y se observaron cada 24 horas durante tres días en busca de cambios visibles en la apariencia del caldo.

3.7. ESTUDIO DE LA MÍNIMA CONCENTRACIÓN DE *L. monocytogenes* DETECTABLE

Se realizaron diluciones seriadas de los inóculos de *L. monocytogenes* (punto 3.2.) de manera de llegar a una concentración de 10 UFC/mL. Para corroborar la concentración del inóculo se sembró 0,1 mL en una placa TSA que se incubó 24 horas en estufa a 36°C. Luego de ese período de tiempo se procedió a realizar el recuento en placa. Una vez verificada la concentración bacteriana deseada se inocularon tubos conteniendo 9 mL de CF con 1 mL del inóculo. Estos tubos se incubaron en estufa a 36°C durante 72 horas, tiempo en el cual cada 24 horas se los observaba en busca de cambios visibles, como el cambio en el color del caldo, la turbidez o la aparición de *pellet*.

3.8. EVALUACIÓN DEL CALDO EN MUESTREO AMBIENTAL SOBRE SUPERFICIES EN UNA AVÍCOLA

Se tomaron muestras ambientales con hisopos en distintas superficies (manos, piletas, cintas transportadoras) en una avícola, cliente de ARAVANLABS, a lo largo de 2 semanas. Los hisopos se encontraban humedecidos en 2 mL de CF. A la misma vez se tomaron muestras iguales con hisopos humedecidos en BLEB, las cuales se utilizaron como estándar de comparación. Tanto las muestras enriquecidas con BLEB como aquellas enriquecidas con CF fueron analizadas mediante estría en placas ACL y PALCAM.

3.9. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD

Para conocer cuán estable era el caldo CF y cuánto tiempo se lo podría almacenar en heladera (a una temperatura de entre 2 y 14°C), se mantuvieron durante dos meses en heladera tubos con 9,9 mL de caldo. Posteriormente fueron inoculados con 0,1 mL de *L. monocytogenes* (1×10^2 UFC/mL y 1×10^3 UFC/mL) e incubados a 36°C durante 72 horas. Cada 24 horas se los observaba en busca de cambios visibles, como cambio en la coloración, la turbidez o la aparición de *pellet*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONTROL DE INÓCULOS

En todos los casos la morfología de las colonias crecidas en placas inoculadas con *L. monocytogenes* se correspondió con la morfología esperada para estas bacterias. En TSA colonias pequeñas redondas y blancas (Figura 1) y en PALCAM colonias redondas, verde oliva y un viraje en la coloración del medio de rojo a negro, como se muestra en la Figura 2. No se observó la presencia de ninguna colonia con morfología extraña, por lo cual se descartó que hubiera contaminación en los tubos (45).



Figura 1. Placa TSA con crecimiento de *L. monocytogenes*, se ven colonias redondas y blancas.



Figura 2. Placa PALCAM con crecimiento de *L. monocytogenes*. Se pueden ver colonias redondas, verde oliva y el medio virado de rojo a negro.

El crecimiento en PALCAM y en TSA de *Listeria spp.* es igual al de *L. monocytogenes*. En el caso de los tubos inoculados con esta bacteria también presentaban el crecimiento en placa esperado y en ningún caso se observó contaminación (45).

En cuanto a los tubos inoculados con *E. coli* y *S. aureus* en ningún caso presentaron crecimiento en PALCAM como era de esperarse ya que, es un medio selectivo y diferencial para *Listeria*. En ambas bacterias se observó el crecimiento esperado en TSA, colonias redondas y amarillas en el caso de *S.*

aureus, redondas y blancas en el caso de *E. coli*. En ninguna placa se observó la presencia de contaminación (34).

4.2. EVALUACIÓN DE LOS CALDOS DE CULTIVO DESARROLLADOS EN ESTE TRABAJO

4.2.1. EVALUACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DEL COMPONENTE F

Para evaluar el efecto de las distintas concentraciones del componente F, se inocularon con *L. monocytogenes* las variantes CF, CD, CDR, CRF y C2F (Tabla 1 y 2). Luego de inocular el caldo CF con *L. monocytogenes* e incubarlo durante 72 horas se observó que las variantes de CF1, CF2 y CF4 presentaron una coloración similar (verde oscuro) (Figura 3). La diferencia entre cada una de estas tres concentraciones en la intensidad del color era apenas notoria. En la concentración 0 g/L no hubo un cambio en la coloración del caldo inoculado con *L. monocytogenes*, este se veía de color amarillo, igual que el blanco. Los cambios en la coloración de CF se apreciaron a las 48 horas de incubación, a las 72 horas no aparecieron nuevos cambios visuales en ningún tubo con caldo. También se pudo apreciar la aparición de un *pellet* como se ve en la Figura 4. Los resultados observados luego de la inoculación e incubación de estos caldos se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Indica los cambios ocurridos en CF0, CF1, CF2 y CF4 luego de ser inoculados e incubados.

Caldo	Tubo	Resultado	Cambio de color	Pellet
CF0	Inoculado	+	no	si
	Blanco	-	no	no
CF1	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no
CF2	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no
CF4	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no

+: indica que el resultado fue positivo. Se tomó como positivo el crecimiento en placa de microorganismos, en este caso para los positivos se tuvo crecimiento en placa de la bacteria inoculada en el caldo, *L. monocytogenes*; -: indica que el resultado fue negativo. Se tomó como negativo que no hubiera crecimiento de ningún microorganismo en placa.



Figura 3. Se muestra CF luego de 72 horas de inoculado con 1×10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes* junto con los blancos de CF para cada concentración del componente F.



Figura 4. Pellet en el fondo de tubo conteniendo CF0, luego de 72 horas de incubación tras ser inoculado con 1×10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes*.

En los tubos conteniendo CRF1, CRF2 y CRF4 inoculados con *L. monocytogenes* se vió a las 48 horas que su coloración había cambiado de rojo a negro, como se puede observar en la Figura 5. En este caldo no se apreció una diferencia visual entre las distintas concentraciones del componente F, aunque sí se vio que el caldo con 0 g/L del componente F presentaba la misma coloración que el blanco, ambos se veían rojos. En CRF a las 72 horas no ocurrieron nuevos cambios visuales. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos luego de la incubación.

Tabla 4. Indica los cambios ocurridos en CRF0, CRF1, CRF2 y CRF4 luego de ser inoculados e incubados.

Caldo	Tubo	Resultado	Cambio de color	Pellet
CRF0	Inoculado	+	no	si
	Blanco	-	no	no
CRF1	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no
CRF2	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no
CRF4	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no

+: indica que el resultado fue positivo. Se tomó como positivo el crecimiento en placa de microorganismos, en este caso para los positivos se tuvo crecimiento en placa de la bacteria inoculada en el caldo, *L. monocytogenes*; -: indica que el resultado fue negativo. Se tomó como negativo que no hubiera crecimiento de ningún microorganismo en placa.



Figura 5. Se muestra CRF0 luego de 72 horas de inoculado con 1×10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes* junto a su blanco y CRF1 también inoculado con 1×10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes* junto a su blanco.

C2F también presentó cambios en su coloración a las 48 horas para todas las concentraciones del componente F, como se observa en la Figura 6. En este caso se pudo apreciar una leve diferencia entre el blanco y el caldo con 0 g/L del componente F inoculado con *L. monocytogenes*, aunque esta diferencia no era muy evidente. Para los caldos con 1 g/L, 2 g/L y 4 g/L del componente F no se notaba una diferencia entre ellos, pero a simple vista la diferencia de coloración con el blanco era evidente. El blanco presentaba un color anaranjado, CF0 presentaba un tono anaranjado más oscuro y los demás caldos con las diferentes concentraciones del componente F eran de un color anaranjado/rojizo. En este caso tampoco aparecieron nuevos cambios en la coloración luego de las 48 horas. Los caldos inoculados con *L. monocytogenes* además presentaban un pequeño *pellet* violeta, como se puede ver en la Figura 7. En la tabla 5 se muestran los cambios observados en los caldos luego de 72 horas de ser incubados.

Tabla 5. Indica los cambios ocurridos en C2F0, C2F1, C2F2 y C2F4 luego de ser inoculados e incubados.

Caldo	Tubo	Resultado	Cambio de color	Pellet
C2F0	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no
C2F1	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no
C2F2	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no
C2F4	Inoculado	+	si	si
	Blanco	-	no	no

+: indica que el resultado fue positivo. Se tomó como positivo el crecimiento en placa de microorganismos, en este caso para los positivos se tuvo crecimiento en placa de la bacteria inoculada en el caldo, *L. monocytogenes*; -: indica que el resultado fue negativo. Se tomó como negativo que no hubiera crecimiento de ningún microorganismo en placa.

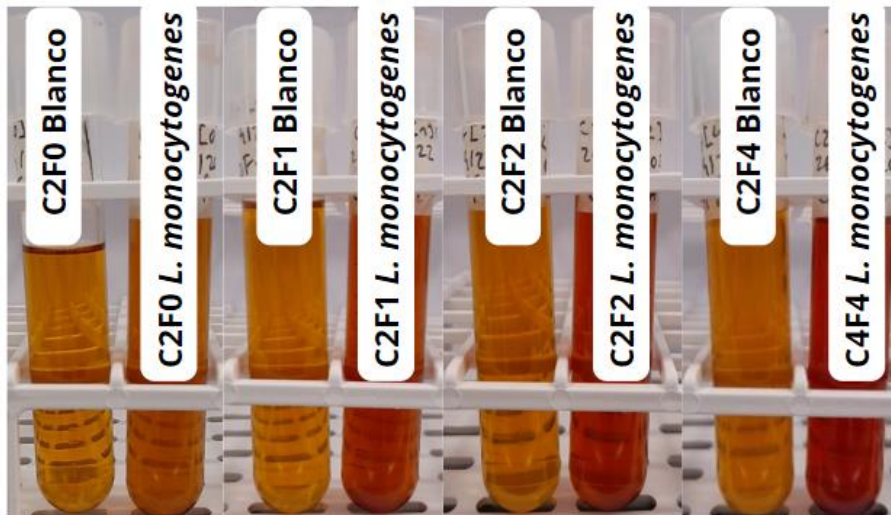


Figura 6. Se muestran todas las variantes de C2F luego de 72 horas de ser inoculado con 1×10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes* junto con los blancos correspondientes para cada caso.



Figura 7. *Pellet* violeta en el fondo de tubo conteniendo C2F, luego de 72 horas de incubación tras ser inoculado con 1×10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes*.

En cuanto a CD, en todas las concentraciones del componente F la apariencia del caldo se vio igual, incluyendo al blanco. Lo único que diferenciaba a los tubos inoculados con *L. monocytogenes* del blanco era la presencia de *pellet* en aquellos que habían sido inoculados. Los resultados de CDR fueron similares a los de CD.

De acuerdo a los resultados obtenidos se optó por descartar los caldos CD y CDR ya que, en ambos la diferenciación entre un caldo positivo para *L. monocytogenes* y uno negativo (ausencia de la bacteria en el mismo) no era evidente a simple vista. A su vez, se optó por utilizar la concentración de 2 g/L del componente F, por ser esta la concentración media que se había utilizado hasta el momento.

4.2.2. EVALUACIÓN DE QUITAR EL COMPONENTE L

En esta instancia del trabajo se probó quitar el componente L, un agente inhibidor. Esto se realizó solamente para CF y las variantes C2F y CRF.

CF (sin el componente L) presentó una coloración amarilla al igual que la formulación de CF con el componente L. La coloración en este caso luego de 48 horas de haber sido inoculado con *L. monocytogenes* fue la misma que con el componente L (como se muestra en la Figura 3), las tres concentraciones de inóculo presentaron el mismo color. En el caso del caldo inoculado con *Listeria spp.*, cambió su coloración a verde claro. Solamente en un tubo inoculado con *S. aureus* hubo cambio de color, a verde claro igual a los tubos inoculados con *Listeria spp.* cómo se puede apreciar en la Figura 8. A las 72 horas de incubación no se apreciaron nuevos cambios en la apariencia del caldo.



Figura 8. Tubos conteniendo el caldo CF sin el componente L en su formulación, inoculados uno de ellos con *S. aureus* y el otro con *Listeria spp.* luego de las 72 horas de incubación.

En cuanto a C2F producido sin el componente L, los cambios en la coloración también se presentaron a las 48 horas de incubación luego de ser inoculados con *L. monocytogenes*. En este caso el caldo se veía de color marrón con un pequeño pellet violeta (similar al que se muestra en la Figura 7). Los tubos con C2F inoculados con *Listeria spp.* viraron su color a anaranjado/amarronado. En ambos casos la coloración se diferenciaba del blanco, el cual presentaba un color ámbar. En la inoculación con *S. aureus* no se observaron cambios en la coloración del caldo.

Por otro lado, cuando se evaluó quitar el componente L del caldo CRF, este no presentó cambios en su coloración en las 72 horas de incubación para ninguna de las bacterias con las que fue inoculado. Los tubos que contenían el caldo CRF habían sido inoculados con *L. monocytogenes*, *Listeria spp.* y *S. aureus* en distintas concentraciones antes mencionadas.

A pesar de que los resultados obtenidos luego de inocular el caldo CRF no fueron los esperados, esto no significó ningún inconveniente al proyecto ya que, los resultados obtenidos en C2F y CF se consideraron buenos (al poder diferenciar entre las bacterias a simple vista). Los cambios en la coloración de los caldos inoculados con las distintas bacterias fueron más visibles en CF, por lo cual se optó por descartar la variante CRF y C2F, y continuar trabajando con CF. Además, como la aparición de una coloración diferente en los caldos inoculados (con *L. monocytogenes*) no se vio afectada por la

ausencia del componente L, se decidió quitarlo de la formulación base de caldo y continuar produciendo las variantes sin el mismo.

4.2.3. EVALUACIÓN DE LOS COMPONENTES A, B, O Y P

Posteriormente a la remoción del componente L, se decidió quitar los componentes A, B, O y P. Es en este contexto que se crearon las variantes de CF, denominadas CA y CSA, las cuales no contenían el componente A, en el caso de CA y en el caso de CSA no contaba con ninguno de los componentes mencionados (A, B, O y P).

El caldo CSA, presentaba un color rosado claro. Luego de ser inoculado con *L. monocytogenes* y *S. aureus* de manera independiente, en todas sus concentraciones, su coloración cambió a gris oscuro. Cuando fue inoculado con *Listeria spp.* la coloración cambió a gris claro. En el caso de la inoculación con *E. coli* no hubo ningún cambio en la coloración del caldo, se mantuvo (igual al blanco) rosado claro. En la Figura 9 se pueden observar los cambios en la coloración de los caldos inoculados con *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Listeria spp.* luego de las 72 horas de incubación.

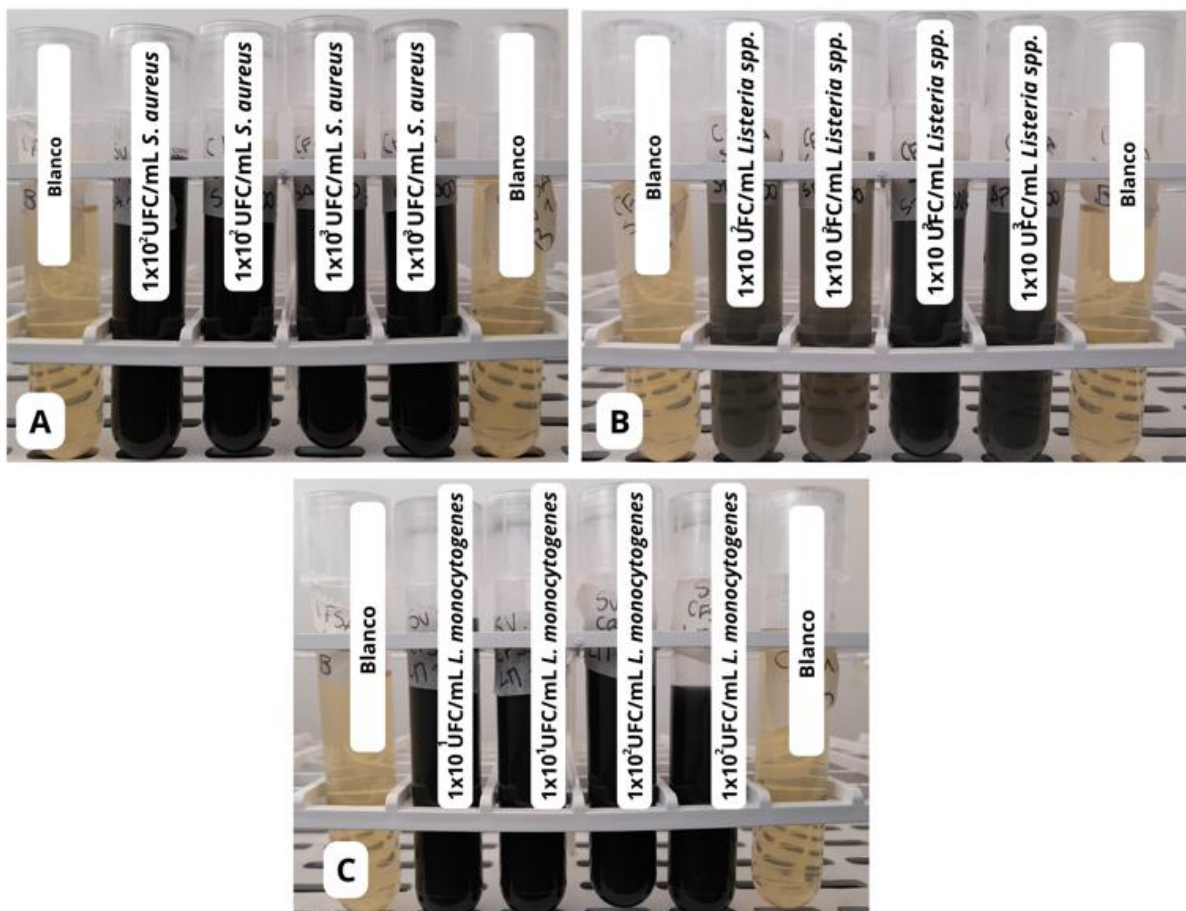


Figura 9. CSA luego de ser inoculado e incubado durante 72 horas. A) CSA inoculado con 1×10^2 y 1×10^3 UFC/mL de *S. aureus*, junto a los blancos; B) CSA inoculado con 1×10^2 y 1×10^3 UFC/mL de *Listeria spp.*, junto a los blancos; C) CSA inoculado con 1×10^2 y 1×10^3 UFC/mL de *S. aureus*, junto a los blancos.

En cuanto a CA presentó una coloración amarilla luego de su producción. Los tubos conteniendo este caldo inoculados con *S. aureus* cambiaron su coloración a verde claro, lo mismo ocurrió con este caldo cuando fue inoculado con *Listeria spp.* y *L. monocytogenes*. El cambio en la coloración del caldo inoculado con *L. monocytogenes* se puede observar en la Figura 10. En ningún caso hubo cambio en la coloración del caldo inoculado con *E. coli*.



Figura 10. CA inoculado con *L. monocytogenes* luego de 72 horas de incubación junto al blanco.

Según los resultados obtenidos en las variantes CA, que tenía una formulación similar a la de CF pero sin el componente A y CSA, que también presentaba una formulación similar a la de CF pero sin los componentes A, B, O y P, se vió que la presencia de estos era importante. Lo cual quedó demostrado ya que en CSA luego de la inoculación con *L. monocytogenes*, *Listeria spp.* y *S.aureus* el caldo presentó un color gris para todas las bacterias, sin poder diferenciarse entre ellas. En el caso de CA, ocurrió algo similar donde todos los tubos inoculados con las tres bacterias cambiaron su coloración a verde, sin poderse diferenciar entre ellas.

4.3. ESTUDIO DE LA SELECTIVIDAD

La selectividad se estudió en CF y en la variante C2F. En cuanto a la selectividad de C2F (sin el componente L), solamente hubo cambios en la coloración del caldo cuando este fue inoculado con *Listeria spp.* o *L. monocytogenes*. A su vez, se pudo diferenciar entre ambas inoculaciones ya que el color del caldo era distinto para cada una de ellas, siendo marrón en el caso de *L. monocytogenes* y anaranjado/amarronado para *Listeria spp.* En los casos en los que fue inoculado con *S. aureus* o *E. coli* no hubo cambios en la coloración del caldo. En la Figura 11 se muestra la coloración de C2F inoculado con todas las concentraciones estudiadas en este trabajo de *L. monocytogenes* y de *Listeria spp.*, además de los blancos. La diferencia entre ambas bacterias es apreciable a simple vista aunque, todos los colores están en la misma gama.

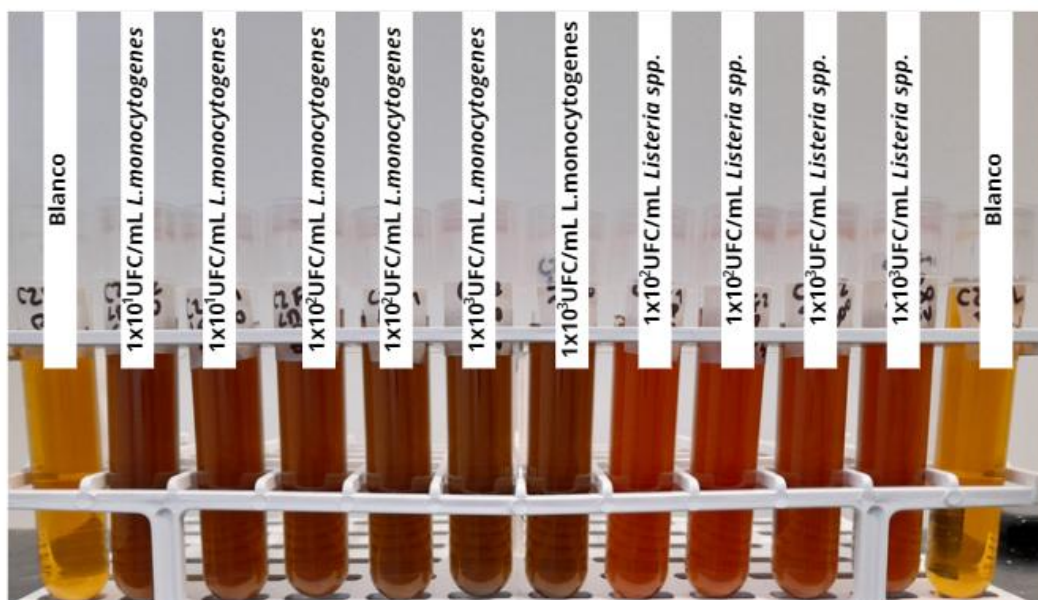


Figura 11. C2F (sin el componente L) inoculado con distintas concentraciones de *L. monocytogenes* (tubos marrones) y *Listeria spp.* (tubos anaranjados/amarronados) y los blancos (color ámbar) en los extremos.

Para el caso de CF también sin el componente L, cuando fue inoculado con *Listeria spp.* y con *L. monocytogenes* presentó cambios en su coloración, que además, al ser diferente el color para cada bacteria se pudo diferenciar cuando se había inoculado con una o la otra. El color del caldo se veía verde oscuro cuando era inoculado con *L. monocytogenes* y verde claro cuando era inoculado con *Listeria spp.* como se muestra en la Figura 12. En cuanto a la inoculación con *E. coli* en ningún momento los caldos presentaron cambios en su coloración, permaneciendo igual al blanco. En todos los casos en los que se inoculó con *S. aureus* no se observaron cambios en la coloración del medio, salvo una vez que se pudo observar que el caldo viró su color a verde claro, del mismo modo que en las inoculaciones con *Listeria spp.*

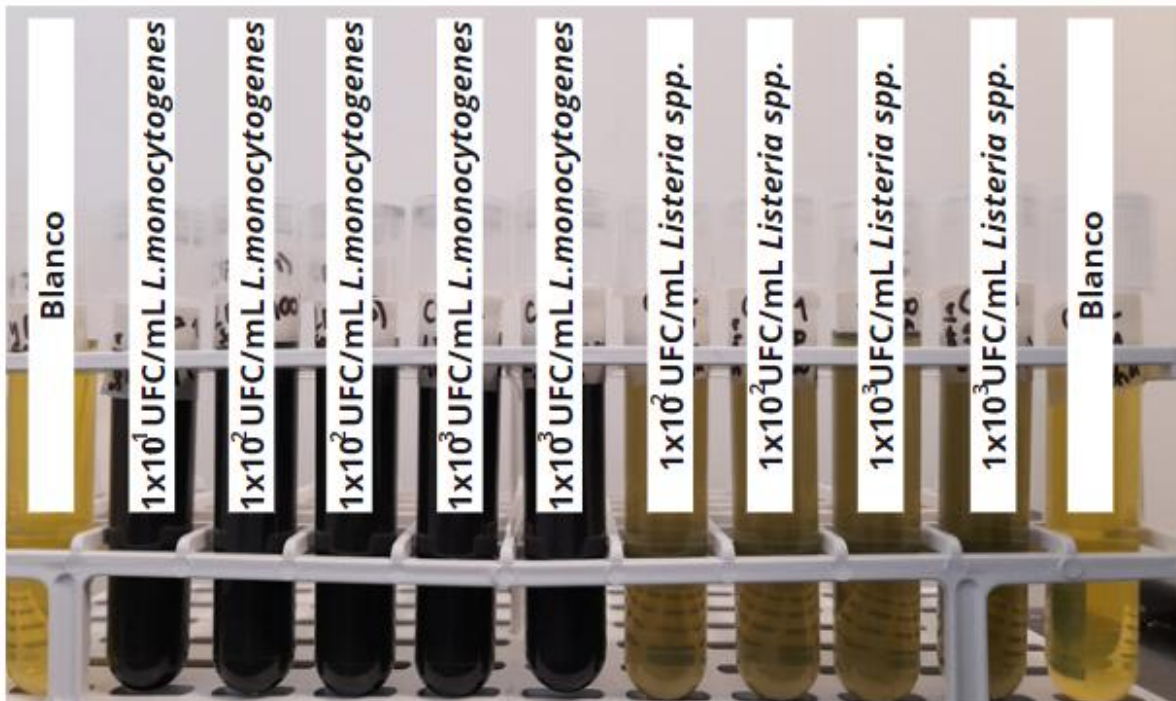


Figura 12. CF (sin el componente L) inoculado con distintas concentraciones de *L. monocytogenes* (tubos verdes oscuros) y *Listeria spp.* (tubos verdes claros) y los blancos (amarillos) en los extremos.

De acuerdo a los resultados obtenidos, C2F demostró ser selectivo para *Listeria* ya que, en todas las inoculaciones con diferentes bacterias (*L. monocytogenes*, *Listeria spp.*, *S.aureus* y *E.coli*) solamente se observó cambio en la coloración y crecimiento en placa para *L. monocytogenes* y *Listeria spp.* En el caso de CF, solamente en un caso hubo cambio en la coloración del caldo inoculado con *S.aureus*, el cual se pudo diferenciar fácilmente de *L. monocytogenes* (presentaba otra coloración). Es importante destacar que ambos caldos son capaces de diferenciar *L. monocytogenes* de *Listeria spp.* siendo más evidente esa diferenciación en CF, es por este motivo que se decidió seguir trabajando sobre el caldo CF.

4.4. MÍNIMA CONCENTRACIÓN DE *L. monocytogenes* DETECTADA POR CF

La menor concentración de *L. monocytogenes* con la cual CF fue inoculado fue de 1 UFC/mL de *L. monocytogenes*. El caldo fue capaz de detectar esta concentración ya que, se tornó verde oscuro diferenciándose del blanco que era amarillo, de la misma manera que ocurrió cuando fue inoculado con concentraciones mayores de *L. monocytogenes*. Este cambio en el color de CF se notó a las 46 horas de ser inoculado. No hubo nuevos cambios en la apariencia del caldo pasadas las 46 horas de incubación.

4.5. EVALUACIÓN DEL CALDO EN MUESTREO AMBIENTAL SOBRE SUPERFICIES EN UNA AVÍCOLA

Las muestras tomadas con hisopos humedecidos en BLEB para el muestreo ambiental de superficies en una avícola tuvieron resultados negativos para la presencia de *L. monocytogenes*, como se indica en la Tabla 6. Se obtuvo el mismo resultado para todas aquellas muestras tomadas con hisopos embebidos en CF que presentaban una coloración amarilla como se puede observar en la Figura 13.

Tabla 6. Resultado del muestreo ambiental en superficies de en una avícola con CF y BLEB.

MUESTRA	BLEB	CF	COLOR CF
1	-	-	amarillo
2	-	-	amarillo
3	-	-	amarillo
4	-	-	amarillo
5	-	-	amarillo
6	-	-	amarillo
7	-	-	amarillo
8	-	-	amarillo
9	-	+/-	verde oscuro
10	-	+/-	verde oscuro
11	-	-	amarillo
12	-	-	amarillo

-: indica que el resultado de analizar el hisopo fue negativo; +/-: indica que el resultado luego de analizado el hisopo fue indeterminado.

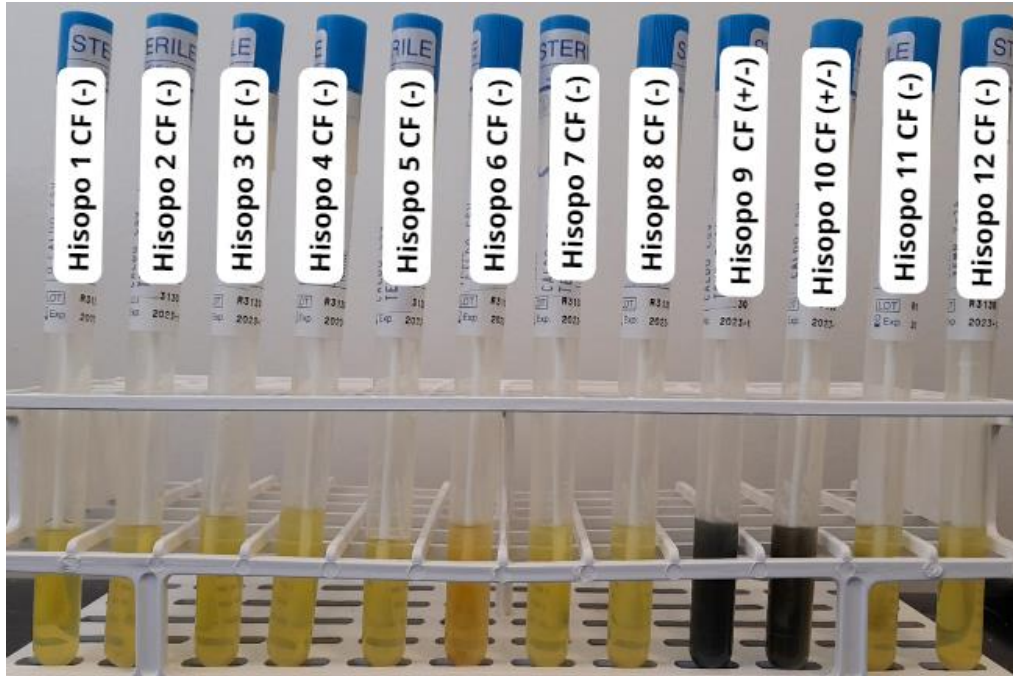


Figura 13. Hisopos conteniendo 2 mL de CF utilizados para muestreo ambiental de superficies en avícola. Aquellos hisopos que presentan un color amarillo tuvieron un resultado negativo para la presencia de *L. monocytogenes*, en cuanto los que presentan una coloración verde oscura tuvieron un resultado indeterminado.

En cuanto a los hisopos que presentan una coloración verde oscura (9 y 10), el resultado de buscar la presencia de *L. monocytogenes* en ellos fue indeterminado. Esto ocurrió porque las placas ACL en las cuales fueron estriados presentaron un crecimiento excesivo y no se pudo observar con claridad la presencia de colonias que presentarían la morfología esperada para *L. monocytogenes*. En estas placas *L. monocytogenes* crece en colonias verde azulado con un halo blanco opaco (38), aunque se observó la presencia de colonias de color verde azulado, no se logró ver el halo, ya que la placa se encontraba casi en su totalidad ocupada por colonias blancas. Además, estos dos hisopos se estriaron en placas PALCAM, pero no se obtuvo el crecimiento esperado. En la Figura 14 se muestran las placas utilizadas. No fue posible continuar analizando las muestras 9 y 10, pero en casos así se debe aislar aquellas colonias presuntivas para *L. monocytogenes* y de esta manera evaluar si presentan las características específicas de la bacteria. Otra opción para verificar si se trata de *L. monocytogenes* es realizar una PCR.

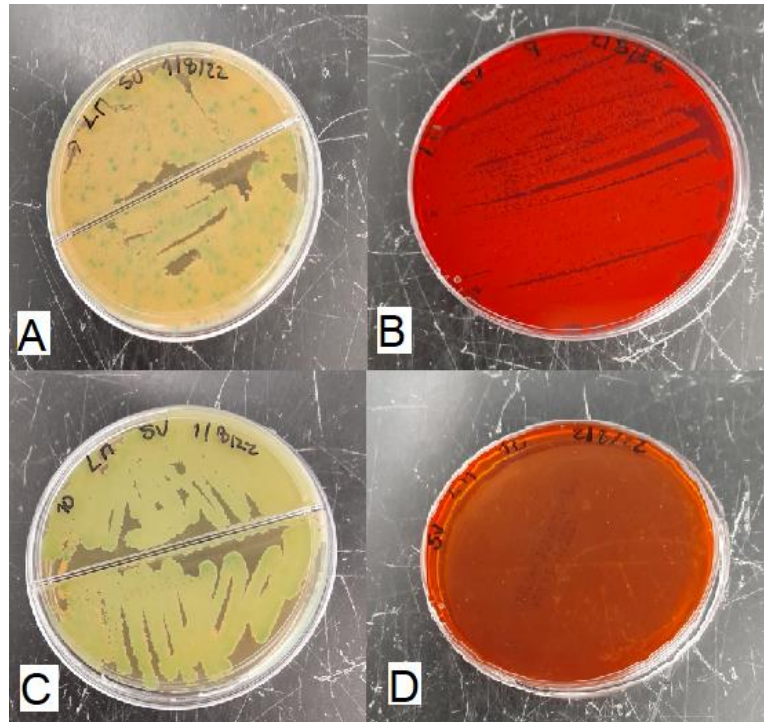


Figura 14. Placas utilizadas para la búsqueda de *L. monocytogenes* en los hisopos CF de color verde oscuro (9 y 10). A) Placa ACL donde se estrió el hisopo 9; B) Placa PALCAM en la cual se estrió el hisopo 9; C) Placa ACL en la cual se estrió el hisopo 10; D) Placa ACL donde se estrió el hisopo 10.

4.6. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD

El caldo CF luego de dos meses de almacenamiento en heladera presentaba una coloración levemente más oscura que el caldo CF con 10 días de producido, como se puede ver en la Figura 15. Además, se podía observar un pequeño precipitado en el fondo del tubo de color gris que se muestra en la Figura 16.

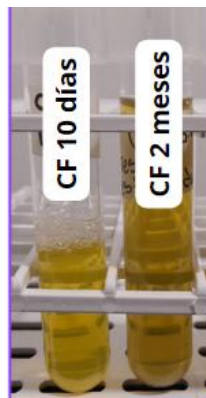


Figura 15. Se muestra un tubo con CF con 10 días de producido y un tubo con CF que se mantuvo almacenado durante 2 meses en heladera, a una temperatura de entre 2 y 14°C. El caldo CF con 10 días de producido también fue mantenido en heladera a la misma temperatura.



Figura 16. Precipitado gris en el fondo de un tubo conteniendo CF, el cual fue almacenado durante 2 meses en heladera a una temperatura de entre 2°C y 14°C.

El caldo fue inoculado con 0,1 mL de los inóculos de concentración 1×10^2 UFC/mL y con 1×10^3 UFC/mL de *L. monocytogenes* (teniéndose una concentración final en el caldo de 1×10^1 UFC/mL y 1×10^2 UFC/mL). A las 48 horas se pudieron ver cambios en su coloración, presentando una apariencia verde oscura en aquellos tubos inoculados. La coloración de los tubos positivos para *L. monocytogenes* fue igual que en los ensayos anteriores, donde se utilizaba caldo producido en el mismo día. En la Figura 17 se puede observar el cambio en la coloración del caldo inoculado con *L. monocytogenes*.

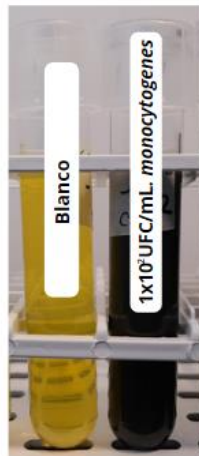


Figura 17. Caldo CF inoculado con 0,1 mL del inóculo que presentaba una concentración de 1×10^2 UFC/mL de *L. monocytogenes* y caldo CF sin inocular (blanco).

5. ANÁLISIS ECONÓMICO

5.1. ANÁLISIS ECONÓMICO Y SITUACIÓN DEL MERCADO URUGUAYO

Se realizó un análisis para evaluar la viabilidad económico financiera del producto desarrollado. Para esto, se estimaron los costos de inversión que se tuvieron al desarrollar el producto, el costo que tendría producirlo en las instalaciones de ARAVANLABS y el precio de detectar *L. monocytogenes* en otros laboratorios uruguayos de manera de fijar un precio apropiado en función de la competencia.

Además, se realizó un estudio de mercado en Uruguay para segmentar el mercado, viendo la oportunidad de negocio y evaluar las posibilidades de venta del producto. Como se mencionó previamente, en los últimos años los brotes de *L. monocytogenes* han ido en aumento, por lo cual la legislación en cuanto a este patógeno es cada vez más estricta. Lo que obliga a los exportadores a estar a la altura de estas exigencias impuestas por los países compradores, generando en ellos la necesidad de tener que realizar mayores controles. En este sentido Uruguay tiene una producción anual de alimentos suficiente para abastecer 28 millones de personas. Solamente en exportaciones cárnicas se rondan los USD 2000 millones anuales. Demostrando que en Uruguay hay un nicho para la aplicación de los análisis de *L. monocytogenes*. (46)(47)

En Uruguay hay 14 laboratorios privados registrados en el registro nacional de laboratorios que se encuentran habilitados para detectar *L. monocytogenes*, cuyos resultados tienen validez oficial. El costo de los análisis para detectar *L. monocytogenes* mediante PCR en estos laboratorios es de aproximadamente USD 90 + IVA por muestra, el precio de un kit de PCR para detectar *L. monocytogenes* es de USD 18,6 + IVA (por muestra). Además, el precio en el mercado local del Petrifilm™ para detectar presuntivamente *Listeria* en ambientes es de aproximadamente USD 13 + IVA (la unidad de Petrifilm™). Estos datos se obtuvieron mediante llamada telefónica a laboratorios y proveedores.

5.2. INVERSIÓN

Para calcular la inversión realizada se tuvo en cuenta todos los materiales desechables utilizados, los componentes y las horas de personal. En este caso no se tuvo en cuenta el costo de utilizar equipos como el autoclave, ya que se utilizó en simultáneo con productos del laboratorio en momentos donde no significó un gasto extra. Tampoco se tuvo en cuenta el gasto energético del establecimiento, ni el mantenimiento de los equipos. En la Tabla 7 se muestran los gastos relacionados a los materiales de un solo uso.

Tabla 7. Costo total de los materiales utilizados durante todo el proyecto para la producción de los caldos.

MATERIAL	CANTIDAD	COSTO/UNIDAD (USD)	COSTO TOTAL (USD)
FILTROS	20	3	60
JERINGAS (10 mL)	20	0,20	4
TUBOS	253	0,44	111,3
PLACAS TSA	125	2,09	261,3
PLACAS PALCAM	85	13,71	1.165,4
PLACAS ACL	2	24,91	49,8
BHI	4	1,8	7,2
BUFFER TPC	54	0,15	8,1
HISOPOS	16	0,27	4,32
COSTO TOTAL:			1.671,4

En cuanto a los componentes utilizados, el costo de inversión de los mismos se muestra detallado en la Tabla 8 y corresponde a todos los componentes utilizados a lo largo del proceso hasta llegar a la formulación con mejores resultados.

Las horas de personal se calcularon en base al tiempo que el personal del laboratorio debió realizar tareas que complementaron al proyecto, como ya sea la generación de placas con medio de cultivo, la capacitación previa a la manipulación en el laboratorio o la supervisión de que las tareas fueran llevadas a cabo correctamente. Por lo cual se estimó en 15 horas, teniendo un costo de USD 86,7.

Tabla 8. Costos de los componentes utilizados para la producción de todos los caldos durante el proyecto.

COMPONENTE	CANTIDAD (g, mL)	COSTO (USD)
Componente L	3,3	10
Componente D	51	216
Componente G	9,2	2,1
Componente H	18	4
Componente I	28,3	8,4
Componente J	4.2	0,9
Componente K	15.4	1,5
Componente M	4.6	0,6
Componente N	3	0,08
Componente R	0.05	8,6

Componente A	0.10	8,5
Componente B	0.03	0,3
Componente O	0.0342	9,9
Componente P	0.02	1,03
Componente Z	0.2	1,8
Componente CT	2.6	29
Componente T	50	177
Componente F	101	169
	COSTO TOTAL:	473,5

Teniendo en cuenta los gastos mencionados y analizados la inversión total que se realizó para desarrollar este producto fue de USD 2.231,6.

5.3. VALIDACION ECONÓMICO FINANCIERA

El costo de producir un hisopo con 2 mL del caldo CF, se calculó en función de los componentes, y los costos asociados que tiene la producción de un caldo similar en ARAVANLABS. En los costos asociados se incluye el costo de las horas del personal, como el fraccionado en sala blanca o el personal de pesado de componentes y el costo del autoclave. Estos datos fueron proporcionados por el personal del laboratorio. Es importante mencionar, que para 100 mL de caldo se estima un rendimiento de 42 hisopos con 2 mL de caldo cada uno, teniendo en cuenta merma y controles de calidad.

5.3.1. MANO DE OBRA

Se calculó el costo estimado de mano de obra necesaria para producir 100 mL de caldo. En este se incluyeron la mano de obra de preparación, que se estimó en dos horas, y la mano de obra de fraccionado en sala blanca, que se estimó en 0,75 horas. El resumen de los costos de mano de obra se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Resumen de los costos de mano de obra.

	TIEMPO (h)	COSTO/h (USD)	COSTO (USD)
Mano de obra preparación	2	6,5	13
Mano de obra fraccionado	0,75	11,6	8,7
		COSTO TOTAL (100 mL)	21,7

El costo total de mano de obra para producir 100 mL de CF, se estimó en USD 21.7. Obteniendo un costo de USD 0.217/mL. Por consiguiente, el costo de producir 2 mL es de USD 0.22.

5.3.2. MATERIALES

En cuanto al costo de los componentes, se calculó en base a la cantidad necesaria de cada componente para producir 1 mL. Los datos también fueron proporcionados por personal del laboratorio. Para conocer el costo por mililitro, primero se calculó el costo de producir 1 L, luego se lo dividió entre 1000 y se multiplicó por 2. Obteniendo, que el costo de los componentes para producir 2 mL de CF es de USD 0,12. En la Tabla 10 se muestra el resumen del costo total de los componentes.

Tabla 10. Componentes necesarios para producir CF.

COMPONENTE	PRECIO (USD)/L de CF
Componente F	3,34
Componente T	40,47
Componente A	0,32
Componente B	0,09
Componente O	2,9
Componente P	2,47
Componente G	3,89
Componente H	0,68
Componente I	1,29
Componente J	0,91
Componente K	0,17
Componente M	0,14
Componente N	1,89
COSTO TOTAL (1 L):	58,6
COSTO TOTAL (1 mL):	0.06
COSTO TOTAL (2 mL):	0,12

Para la producción es además necesario contar con una jeringa y un filtro de jeringa, cuyos costos son USD 0,2 y USD 3 respectivamente. Por lo cual el costo de utilizar estos materiales para producir 2 mL es de USD 0,06.

Además, se tuvieron en cuenta otros costos fijos asociados a la producción, de USD 0,5/unidad. Entendiéndose como unidad un hisopo de CF. Sumando el costo de los materiales más los costos de mano de obra y los costos fijos asociados se llega a que el costo total de producir un hisopo con 2 mL de CF es de USD 0,9.

5.4. FIJACIÓN DEL PRECIO DE CF

Se sugiere un precio inicial para entrar al mercado, que se encuentre por debajo del precio de la competencia, al menos los primeros dos años mientras el producto es conocido y validado por los clientes, de USD 12/unidad. Transcurrido ese tiempo, como este producto es capaz de diferenciar entre *L. monocytogenes* y *Listeria spp.*, distinguiéndose de productos sustitutos, se podría aumentar el precio un 10%. Teniéndose un precio de USD 15/unidad, el cual se encuentra por encima de Petrifilm™ pero por debajo del precio de realizar una PCR.

6. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS A FUTURO

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un producto capaz de detectar de manera presuntiva *L. monocytogenes* en un solo paso mediante microbiología clásica. Para el cual se diseñaron, realizaron y testearon varias tandas de caldos hasta lograr obtener una formulación que cumpliera con el objetivo. En este sentido el objetivo general pautado fue logrado.

En cuanto al producto desarrollado demuestra ser prometedor y de fácil manipulación en la industria alimentaria. Como se demostró pudo ser utilizado para tomar muestras ambientales de superficies en un establecimiento avícola.

A pesar de ser un producto prometedor, aún debe pasar por un mayor número de instancias evaluatorias antes de ser comercializado. Proceso que podría llevar un tiempo medianamente largo y un mayor número de personal, donde se evaluaría con mayor profundidad parámetros como la estabilidad en el tiempo (superior a 2 meses), selectividad con un mayor número de microorganismos, e incluso se podrían utilizar técnicas moleculares para validar los resultados.

Previo a la comercialización se debe realizar un estudio de la inversión necesaria para la promoción de producto. La cual requiere que el cliente entre en contacto con él, pudiendo repartirse muestras gratis como una manera de hacerlo conocer.

A su vez, en caso de que exista interés en exportar el producto, se deberán tener en cuenta las regulaciones y los requerimientos del mercado destino.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRFICAS

1. Chanqueo, L., Gutierrez, C., Armas, R., Urriola, G., Bustos, M., Tapia, C., Vasquez, P. Bacteriemia primaria por *Listeria monocytogenes* en paciente con cirrosis hepática. Caso clínico. Rev Méd Chile [internet], [2008 citado 5 de Agosto 2022]; 136: 225-229. Disponible desde: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872008000200013
2. Vera, A., Gonzalez, G., Dominguez, M., Bello, H. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación, Rev Chilena Infectol. [internet] 2013 [citado 5 de Agosto 2022]; 30 (4): 407-416. Disponible desde: <https://sochinf.cl/>
3. Seoane, M. *Listeria monocytogenes*, Rev Chilena Infectol. [internet] 2013 [citado 5 de Agosto 2022]; 30 (4): 405-416. Disponible desde: <https://sochinf.cl/>
4. Trepát, M. Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavo curadas (Tesis de grado). Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona; 2002.
5. Rodríguez-Auad, J. Panorama de la infección por *Listeria monocytogenes*, Rev Chilena Infectol. [internet] 2018; [citado 5 de Agosto 2022]; 35 (6): 649-657. Disponible desde: <https://sochinf.cl/>
6. Olstein, A., Feirtag, J. An Improvement on selective enrichment media for detection of environmental *Listeria spp.* J Bacteriol Parasitol, [internet] 2015 [citado 5 de Agosto 2022]; 6: 234. Disponible desde: doi:10.4172/2155-9597.1000234
7. Werth, B. Generalidades sobre las bacterias - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales. [internet] 2022 [citado 5 de Agosto 2022]; Disponible desde: <<https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/bacterias-y-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/generalidades-sobre-las-bacterias>>
8. Ministerio de Agricultura, Área soporte al análisis de Riesgo [internet] 2017 [citado 8 de Agosto 2022]; Disponible desde: <https://www.achipia.gob.cl/wp-content/uploads/2018/03/Ficha-Peligro-04-Listeria-v01.pdf>
9. Chico-Calero, I., Suárez, M., López, V., Martínez-Suárez, J. V., Navas, J. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos?. Revista Argentina de Microbiología, [internet]. 2006 [citado 5 de Agosto 2022]; 38(4),224-234. Disponible desde: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=213016794011>
10. FDA. *Listeria* (listeriosis) [Internet]. EE.UU; 2022 [citado 2022 Agosto 10]; Disponible desde: <https://www.fda.gov/food/foodborne-pathogens/listeria-listeriosis>
11. Dinatale, F, Cardozo, L, Vera, A, Sandoval, A. Determinación de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* y coliformes en queso Paraguay comercializado en diferentes puntos de venta de las ciudades; Compendio de Ciencias Veterinarias, [internet] 2020 [citado 2022 Agosto 10]; 10 (2), 12-20. Disponible desde: <https://dx.doi.org/10.18004/compend.cienc.vet.2020.10.02.12>
12. Lopez, J., Rodriguez, C., Lopez, V., Díaz, B. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos artesanales expendidos en mercados públicos de la ciudad de Riobamba, Ecuador. Pol. Con. [internet] 2013 [citado 2022 Agosto 10]; 67 (7), 1476-1487. Disponible desde: <https://polodelconocimiento.com/ojs/index.php/es>
13. Tavares do Couto, C., Nunes, L., Marques, A., Godinho, G. Listeriosis in the far South of Brazil: neglected infection? Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. [internet] 2013 [citado 2022 Agosto 10]; 46(3), 381-383. Disponible desde: <https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/dWvrncGRG5ShmkjLZ493TWv/?lang=en#>
14. Ministerio de Salud y Protección Social, Unidad de Evaluación de Riesgos para la Inocuidad de los Alimentos UERIA Instituto Nacional de Salud. [internet] Colombia; 2011 [citado 2022 Agosto 10]; Disponible desde: https://www.researchgate.net/publication/266069853_EVALUACION_DE_RIESGOS_DE_Listeria_monocytogenes_EN_QUESO_FRESCO_EN_COLOMBIA
15. Cuéllar, E., Chiappe, A., Velarde, J., Holguín, A., Portillo, D., Vicente, W. . Bacteriemia por *listeria* en pacientes de un instituto oncológico peruano, 2005-2015. Revista Peruana de

- Medicina Experimental y Salud Pública, [internet] 2021 [citado 2022 Agosto 10]; 38(1), 108-112. Disponible desde: <https://dx.doi.org/10.17843/rpmesp.2021.381.5488>
16. Ministerio de Salud Pública, División epidemiología [internet] Uruguay; 2017 [citado 2022 Agosto 10] Disponible desde: <https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/sites/ministerio-salud-publica/files/documentos/publicaciones/Bolet%C3%ADn%20epidemiol%C3%B3gico%20Mayo%202017.pdf>
 17. Braga, V., Vázquez, S., Vico, V., Pastorino, V., Mota, M., Legnani, M., Schelotto, F., Lancibidad, G., Varela, G. Prevalencia y distribución de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislado de alimentos en Montevideo-Uruguay brazilian journal of microbiology [Internet] 2017 [citado 2022 Agosto 10]; 4 (8) 689–694. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.01.010>.
 18. Department of Primary Industries, Food Authority [internet] Australia; 2016 [citado 2022 Agosto 10]; Disponible desde: <https://www.foodauthority.nsw.gov.au/>
 19. Garcia, J., Gil, J., Botero, S., Valencia, F. Control de crecimiento de *Listeria monocytogenes* en co-cultivo con *Lactobacillus plantarum*. Rev. Colomb. Biotecnol. [internet] 2018 [citado 2022 Agosto 8]; (20) 68 - 77. Disponible desde: DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v20n2.77064
 20. Tafur, M. La inocuidad de alimentos y el comercio internacional. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias [internet] 2009 [citado 2022 Agosto 8]; 22 (3), 330-338. Disponible desde http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-06902009000300009&lng=en&tlng=es.
 21. Hamilton, A. Prevalence of indicator organisms, equipment assessment of risk, and lexicon development: an analysis of the tomato packinghouse environment. (Tesis de Máster). Tennessee: Universidad de Tennessee; 2018. Disponible desde: https://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/5142
 22. Beresford, M., Andrew, P., Shama, G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments. Journal of Applied Microbiology [internet] 2001 [citado 2022 Agosto 8]; (90) 1000-1005 Disponible desde: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01330.x>
 23. Burnett, S., Beuchat, L. Human pathogens associated with raw produce and unpasteurized juices, and difficulties in decontamination. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology [internet] 2018 [citado 2022 Agosto 8]; (27) 104–110. Disponible desde: <https://link.springer.com/article/10.1038/sj.jim.7000106>
 24. Desai, A., Anyohac, A., Madoff, L., Lassmann, B. Changing epidemiology of *Listeria monocytogenes* outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. International Journal of Infectious Diseases [internet] 2019 [citado 2022 Agosto 8]; (84) 48–53 Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.04.021>
 25. Dirección general de servicios ganaderos, división industria animal [internet] Uruguay; 2013 2019 [citado 2022 Agosto 8]; Disponible desde: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-09/DGSG_N%C2%BA_96_12_04_2013_Norma_Reglam_08_04_2013_res.pdf
 26. Dirección general de servicios ganaderos, división industria animal [internet] Uruguay; 2013 2016 [citado 2022 Agosto 8]; Disponible desde: https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/2020-10/DGSG%20N%C2%BA%20304_2016_Proc_Prog_Verif_Of_Listeria_%20Monocy_en%20Medioamb_industrializ%20hab_res.pdf
 27. Reglamento Bromatológico Nacional, 5ª edición. (2012) [citado 2022 Agosto 8] Disponible desde: <https://montevideo.gub.uy/sites/default/files/biblioteca/bromatologico5a.edicion.pdf>
 28. Reglamento (CE) N°2073/2005 (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) 15 de Noviembre de 2005. Disponible desde: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:02005R2073-20140601>

29. Archer, D. The evolution of FDA's policy on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in the United States. Current Opinion in Food Science [internet] 2018 [citado 2022 Agosto 8]; (20) 64-68. Disponible desde: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.03.007>.
30. Willey, J., Sherwood, L. and Woolverton, C., Prescott, Harley, and Klein's Microbiology. 7th ed. Nueva York: Colin Wheatley/Janice Roerig-Blong; 2008.
31. Gómez, G., Batista, C. Optimización De Medios De Cultivos Para Microorganismos, Una Valiosa Estrategia Para La Producción De Biopreparados De Interés Agrícola. Cultivos Tropicales, [internet] 2006 [citado 2022 Agosto 8]; vol. 27, no. 3, p. 17-24 Disponible desde: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215825002.pdf>
32. Merck. Preparación de los medios de cultivo microbiológico. [Internet] [citado Octubre 2022]; Disponible desde: <https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/applications/microbiological-testing/microbial-culture-media-preparation>
33. Schelgel, H. and Zaboroch, C. Microbiología general. 7th ed. Barcelona: Omega, p.196
34. Bioser. Trypto – Casein Soy Agar (TSA). [Internet] 1997 [citado 2022 Octubre 2] Disponible desde: <https://www.bioser.com/productos/trypto-casein-soy-agar-tsa-74p/>
35. Merck. Fraser broth, base. [Internet] [citado 2022 Octubre 2]; Disponible desde: https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/product/sial/69198?gclid=CjwKCAjw7eSZBhB8EiwA60kCW7BnyRat753V2JenGpOzn7U5pCn3dMe0d7hac9i5YtZtqO8P7zK2hhoCn3lQAvD_BwE&gclid=aw.ds
36. Merck. PALCAM *Listeria* Selective Agar. [Internet] [citado 2022 Octubre 2]; Disponible desde: <https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/product/sial/75977>
37. Neogen. Buffered *Listeria* Enrichment Broth Base. [Internet] [citado 2022 Octubre 2]; Disponible desde: <https://www.neogen.com/es/categories/microbiology/buffered-listeria-enrichment-broth-base/>
38. Condalab. Base de Agar Cromogénico para *Listeria* de Acuerdo a Ottaviani y Agosti (ALOA) ISO. [Internet] [citado 2022 Octubre 2]; Disponible desde: <https://www.condalab.com/medios-de-cultivo-para-agnostico/1107-14961-base-de-agar-cromogenico-para-listeria-de-acuerdo-a-ottaviani-y-agnosti-aloa-iso.html>
39. Neogen. Harlequin® *Listeria* Chromogenic Agar (Ottaviani & Agosti) (LCA). [Internet] [citado 2022 Octubre 2]; Disponible desde: <https://www.neogen.com/es/categories/microbiology/harlequin-listeria-chromogenic-agar-ottaviani-and-agnosti/>
40. Torres, K., Poutou, R., Carrascal, A., Sierra, S., Mercado, M. Validación de pcr para detección de *listeria monocytogenes* en carnes crudas de res y pollo. Revista MVZ Córdoba [internet] 2004 [citado 2022 Agosto 8]; (9) 414-427. Disponible desde: <https://www.redalyc.org/pdf/693/69390202.pdf>
41. Romer Labs. *Listeria* Kits de análisis. [Internet] [citado 2022 Octubre 2]; Disponible desde: <https://www.romerlabs.com/es/analitos/patogenos-en-alimentos/listeria/#:~:text=RapidChek%C2%AE%20Listeria%20cuenta%20con,en%20forma%20r%C3%A1pida%20y%20flexible>
42. Microkit: Medios de Cultivo. Microstick-*listeria*. [Internet]. [citado 2022 Octubre 2]. Disponible desde: <https://www.medioscultivo.com/microstick-listeria-2/>
43. Junillon, T., Flandrois, J. Diminution of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride toxicity on *Listeria monocytogenes* growth by iron source addition to the culture medium. Food Microbiology [internet] (2013) [citado 2022 Agosto 8]; (38) 1-5. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2013.07.005>
44. Blanco, M. Recuperación de *Listeria monocytogenes* dañada subletalmente por efecto de la congelación. (Tesis doctoral). Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1994.
45. Fernandez, M. Control microbiológico de *Listeria monocytogenes* en alimentos para consumo destinado a lactantes. (Tesis de grado). Sevilla: Universidad de Sevilla; 2016.
46. Alonso, A. Métodos de detección y control de *L. monocytogenes* en la industria alimentaria. (Tesis de Máster). Oviedo: Universidad de Oviedo; 2018. Disponible desde:

- https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/47625/TFM_AnaAlonsoMu%F1iz.pdf;jsessionid=267B38A22687D3F48D325DCE3B73E71D?sequence=3
47. Exportaciones cárnicas alcanzaron en 2021 a 530.000 toneladas y 2.300 millones de dólaresfo [Internet] Uruguay; 2021 [citado Agosto 10, 2022]; Disponible desde: <https://www.gub.uy/presidencia/comunicacion/noticias/exportaciones-carnicas-alcanzaron-2021-530000-toneladas-2300-millones-dolares>
 48. Merck. Brain Heart Infusion Broth. [Internet] [citado 2022 Octubre 2]; Disponible desde: <https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/product/sial/53286>
 49. Merck. Tryptone Soya Yeast Extract Agar. [Internet] [citado 2022 Octubre 2]; Disponible desde: https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/product/sial/93395?gclid=CjwKCAjw4c-ZBhAEIiwAZ105RcLKd6cmer3ey2iadp79d0RzrFZGDUyCVpUPzIOXXGXaZTBkfbTWRoCkeoQAvD_BwE&gclsrc=aw.ds
 50. Merck. Tryptic Soy Broth. [Internet] [citado 2022 Octubre 2]; Disponible desde: https://www.sigmaaldrich.com/UY/es/substance/trypticsoybroth1234598765?gclid=Cj0KCQjw kOqZBhDNARIsAACsbfI371KXa78AKcodQ0-Aa5j-im5mdMNPQtUQxMU4jhwVilHnVcHlvVoaAq7IEALw_wcB&gclsrc=aw.ds

ANEXO 1

Tabla 11. Formulación ACL (38).

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
Digerido enzimático de caseína	6
Agar bacteriológico	13,5
Cloruro sódico	5
Piruvato sódico	2
Digerido enzimático de tejido animal	18
Glicerofosfato magnésico	1
Glucosa	2
Sulfato magnésico	0,5
Hidrogenofosfato de sodio	2,5
Extracto de levadura	10
Cloruro de litio	10
5-bromo-4-cloro-3-indolil-B-D-glucopiranosido	0,05

Tabla 12. Formulación BHI (48).

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
Infusión de cerebro y corazón de (sólidos)	8
Digerido péptico animal	5
Cloruro sódico	5
Digerido pancreático de caseína	16
Glucosa	2
Extracto de levadura	10
Fosfato disódico de hidrógeno	2,5

Tabla 12. Formulación PALCAM (36).

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
Peptona vegetal	23,0
Almidón	1,0
Cloruro sódico	5,0
Manitol	10,0
Citrato férrico amónico	0,5
Esculina	0,8
Dextrosa	0,5
Cloruro de litio	15,0
Rojo fenol	0,08
Agar	13,0

Tabla 13. Formulación TSA (34).

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
Triptona	15,0
Digerido papainico de soja	5,0
Cloruro sódico	5,0
Agar	15,0

Tabla 14. Formulación TSA/YE (49).

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
Hidrolizado enzimático de caseína	17,0
Dextrosa	2,5
Digerido papainico de soja	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Extracto de levadura	6,0
Fosfato de hidrógeno dipotasio	2,5
Agar	15,0

Tabla 15. Formulación TSB (50).

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
Glucosa	2,5
Digerido péptico de harina de soja	3,0
Digerido pancreático de caseína	17,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato potásico de hidrógeno	2,5

ANEXO 2

Tabla 16. Diferencia en las concentraciones del componente "F" de los caldos CF, CD, CRF, CDR y C2F.

CALDO	COMPONENTE	CONCENTRACIÓN (g/L)
CF0	F	0
CF1	F	1
CF2	F	2
CF4	F	4
CD0	F	0
CD1	F	1
CD2	F	2
CD4	F	4
CRF0	F	0
CRF1	F	1
CRF2	F	2
CRF4	F	4
CDR0	F	0
CDR1	F	1
CDR2	F	2
CDR4	F	4
C2F0	F	0
C2F1	F	1
C2F2	F	2
C2F4	F	4

F: componente "F"