

# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos



Determinación de *Listeria monocytogenes* en leche cruda,  
de fincas lecheras del área de la costa sur.

Mario Alejandro Cordero Arévalo

Guatemala

2006



**Determinación de *Listeria monocytogenes* en leche cruda,  
de fincas lecheras del área de la costa sur.**

# UNIVERSIDAD DEL VALLE DE GUATEMALA

Facultad de Ciencias y Humanidades

Departamento de Ingeniería en Ciencias de Alimentos



**Determinación de *Listeria monocytogenes* en leche cruda,  
de fincas lecheras del área de la costa sur.**


Trabajo de investigación presentado para optar al grado académico  
de Licenciatura en Ingeniería de Ciencias de los Alimentos

**Mario Alejandro Cordero Arévalo**

**Guatemala**

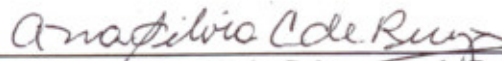
**2006**

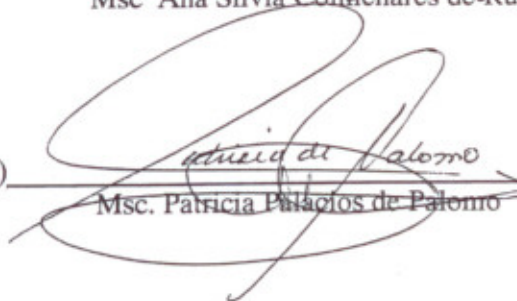
Vo.Bo

(f)   
Licda Teresita Aguilar de Miranda

Tribunal

(f)   
Licda Teresita Aguilar de Miranda

(f)   
Msc Ana Silvia Colmenares de Ruiz,

(f)   
Msc. Patricia Palacios de Palomo

Fecha aprobación: 17 de mayo 2006

# ÍNDICE

Lista de tablas	ii
Lista de ilustraciones	iii
Summary	iv
Resumen	v
I. Introducción	1
II. Antecedentes	2
A. Listeria en el mundo	2
B. Microbiología de la leche	5
C. Características de <i>Listeria monocytogenes</i>	6
D. Incidencia	13
E. Propiedades térmicas	13
F. Aislamiento y cultivo	14
III. Justificación	16
IV. Objetivos	17
V. Metodología	18
A. Toma de muestras	18
B. Diagrama de flujo del método utilizado	19
VI. Materiales	21
A. Cristalería	21
B. Equipo	21
C. Medios de cultivo	22
VII. Resultados	23
VIII. Discusión	28

IX. Conclusiones	31
X. Recomendaciones	32
XI. Bibliografía	33
XII. Anexos	36

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Casos comprobados y sospechosos de listeriosis transmitida por Alimentos	3
2. Predominio de <i>Listeria monocytogenes</i> en diversos alimentos	9
3. Valores D y Z calculados en muestras de leche contaminadas	14
4. Identificación Api listeria	25
5. Resultados tabulados a partir de la prueba Api listeria	27
6. Nombres de las fincas, localización geográfica, fecha de muestreo y tipo de ordeño realizado	36
7. Resultados de presencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en tubo fraser y resultados de mini vidas	37
8. Cantidad y valor de productos fabricados año 2000 (Datos INE)	38
9. Consumo de alimentos, <i>per cápita</i> diario en gramos por área urbana y rural	39
10. Consumo de alimentos, <i>per cápita</i> diario en gramos por categoría de ingreso	39
11. Consumo de alimentos, <i>per cápita</i> diario en gramos por región de consumo	39
12. Distribución porcentual de los hogares a nivel nación por causas de no consumo de alimento	39
13. Distribución porcentual de los hogares por área urbana y rural y forma de adquisición de alimento	40
14. Concentración de desinfectante requerido para desinfectar las superficies contaminadas con <i>Listeria monocytogenes</i> (tiempo de contacto 10 min.)	40

## LISTA DE ILUSTRACIONES

Ilustraciones	Página
1. Prevalencia de <i>L. monocytogenes</i> encontrada en fincas de la costa sur	23
2. Porcentaje de muestras positivas con <i>Listeria monocytogenes</i> de las 45 recolectadas	24
3. Porcentaje de bacterias que hidrolizan esculina	24
4. Resultado de prueba Api listeria con muestra contaminada	27

## SUMMARY

A sampling was made in 34 properties that count on a cattle for milk production this one is used with consumption or process aims, with the object to determine the presence of *Listeria monocytogenes*.

For it, 45 milk samples in property of the department of Escuintla and Santa Rosa in the municipalities of La Gomera, Sipacate, La Democracia, El Panal, Los Cerros, Las Posas, Santa Lucia and Patulul.

For the isolation of *L. monocytogenes* worked with 25 milliliter of sample, inoculating first in a broth of preenrichment Fraser by 24 hours to 30°C and in Fraser broth in tube by 24 hours to 30°C.

The inoculated samples were come to seed in multiparametric instruments LM02 and by means of the analyzer mini Vidas presence or absence of the bacterium was detected.

The positive samples in the multiparametric instruments were seeded in agar Oxford and a colony of Oxford was isolated in Agar Tripticasa Soya with leavening extract to 5% to be able to make the identification in strips of API *Listeria*.

The results of the milk analyses threw the presence of *L. monocytogenes* in 2 farms, equivalent to a 6%.

## RESUMEN

Se realizó un muestreo en 34 fincas que cuentan con ganado para producción de leche y ésta se usa con fines de proceso o de consumo, con el objeto de determinar la presencia de *Listeria monocytogenes*.

Para ello, se recolectaron 45 muestras de leche en fincas del departamento de Escuintla y Santa Rosa en los municipios de La Gomera, Sipacate, La Democracia, El Panal, Los Cerros, Las Posas, Santa Lucía y Patulul.

Para el aislamiento de *L. monocytogenes* se trabajó con 25 mL de muestra, inoculando primero en un caldo de preenriquecimiento Fraser por 24 horas a 30°C y luego en caldo Fraser en tubo por 24 horas a 30°C.

Las muestras inoculadas se procedieron a sembrar en tiras mini Vidas LM02 y por medio del analizador mini Vidas se detectó presencia o ausencia de la bacteria. Las muestras positivas en mini Vidas fueron sembradas en agar Oxford y una colonia de Oxford fue aislada en Agar Tripticosa Soya con extracto de levadura al 5% para poder hacer la identificación en tiras de Api Listeria.

Los resultados de los análisis de leche arrojaron la presencia de *L. monocytogenes* en 2 fincas, equivalente a un 6%.

## I. INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* es la bacteria causante de la enfermedad conocida como Listeriosis, que se asocia con el consumo de alimentos contaminados con esta bacteria. Se ha reconocido recientemente como un importante problema de salud en el mundo entero. Esta enfermedad afecta principalmente a mujeres embarazadas, niños recién nacidos, y adultos con el sistema inmune debilitado

Existe evidencia que alrededor de 1,000 células/ml de *Listeria monocytogenes* en un alimento puede causar Listeriosis en personas susceptibles. Normalmente, este microorganismo prolifera a números potencialmente peligrosos calculándose que la dosis infectiva en un alimento esta en el rango de  $2.7 \times 10^6$  a  $3.4 \times 10^9$  células/ml

Las infecciones agresivas pueden producir septicemia, meningitis, encefalitis, infección del sistema nervioso central, y posiblemente la muerte. Estos síntomas pueden precederse por síntomas gastrointestinales como náuseas, vómitos y diarreas, fiebre o dolor de cabeza.

Actualmente en Guatemala el Departamento de Control de Alimentos, del Ministerio de Salud, reconoce que la industria alimenticia se ve afectadas por esta y otras bacterias, en mayor proporción la industria láctea. Aún así, no se cuenta con datos que reflejen la incidencia de *Listeria monocytogenes* en estos productos.

## II. ANTECEDENTES

### A. *Listeria* en el Mundo

Es posible que *Listeria monocytogenes* hubiese sido descrita por primera vez en 1911 por Hullphers, su descripción sin ambigüedades fue hecha en 1923 por Murray. Desde entonces se ha comprobado que se trata de una bacteria que es patógena para más de 50 especies de animales entre las cuales se incluyen la especie humana, además de serlo para aves, garrapatas, peces y crustáceos. El primer caso de listeriosis humana fue reportado en 1929 y desde entonces se ha comprobado que esta enfermedad se presenta esporádicamente en todo el mundo (Jay 1992).

El nombre del género deriva del nombre del cirujano inglés, Lord J. Lister. Constituye un género de clasificación incierta, anteriormente perteneciente a la familia *Corynebacteriaceae*. Recientemente ha sido propuesta la creación de una nueva familia *Listeriaceae*. (Galves 1997)

En Guatemala se reconoce este microorganismo desde 1986 cuando se reportó el primer caso de listeriosis neonatal (Reyna 2002).

Estudios sobre la prevalencia de *Listeria monocytogenes* en quesos se han reportado en muchos países como Estados Unidos, Reino Unido, Alemania, Italia, Holanda y Suiza. Existe una prevalencia del 0.55% al 14% y los niveles de mortalidad van del 28% al 33 % (Pitt *et al.* 1999).

Se ha encontrado que *Listeria monocytogenes* es prevalente en carne roja, aves de corral, pescado, productos lácteos y, por lo tanto, en el ambiente de plantas de procesamiento de estos alimentos. A causa de brotes de listeriosis a finales de 1988 y principios de 1999, de las memorias existentes y la información sobre el patógeno, es un riesgo razonable de que ocurra contaminación en productos “listos para comer” derivados de carnes, aves de corral y productos lácteos (Reyna 2002).

En la tabla # 1 se detallan los casos más trascendentes de listeriosis alrededor del mundo.

**Tabla # 1 Casos comprobados y sospechosos de listeriosis transmitida por alimentos.**

AÑO	LUGAR	SINOPSIS DE LOS CASOS
1953	Alemania	Mujer embarazada que bebió leche cruda procedente de una vaca con mastitis atípica dio a luz antes de tiempo gemelos muertos. En la leche y en los fetos fue aislada la misma serovariedad.
1958	Rusia	Microorganismo aislado en las vísceras de cerdos sacrificados para carne, en una granja en la que se presentó una enfermedad parecida a la mononucleosis infecciosa. No se aisló de las víctimas.
1959	Suecia	4 casos, mueren 2 niños. El serotipo 2 fue aislado en todas las personas. La carne procedía del mismo establecimiento, pero no se obtuvo aislamientos.
1966	Halle, Alemania	En 1964 y 1965, hubo 23 y 15 casos respectivamente, de listeriosis humana y en 1966, 279 casos. Aunque no se descubrió el origen, el 97% de 144 madres embarazadas habían tomado leche pasteurizada y sólo 2 de las 144 habían tomado leche cruda. Todas habían consumido otros lácteos, frutas y hortalizas, y el 68 % de las madres que abortaron habían comido un producto de carne de vaca cruda. De 3,000 bovinos investigados, sólo 2 padecían listeriosis.
1979	Boston	Entre septiembre y octubre, 23 casos en adultos, Del 87% se aisló la serovariedad 4b. De los 20 enfermos con edades comprendidas entre 46 y 89 años 3 murieron. 10 de los 20 eran inmunosuprimidos. La mayoría estaban hospitalizados y casi todos habían tomado antiácidos o cimetidina. Se creyó que fueron las hortalizas crudas, y no la leche pasteurizada, la posible fuente de infección.
1980	Auckland, Nueva Zelanda.	Durante un período de 11 meses, hubo 22 casos de listeriosis perinatal, se observaron en 3 hospitales. Casi todos debidos a serovariedad 1b. Se produjeron 5 muertes de fetos. No se determinó la fuente, aunque se pensó que pudieron ser debidas al consumo de mariscos y pescado crudos. De los alimentos no se obtuvieron cultivos.
1981	Canadá, provincias	Entre marzo y septiembre, 41 casos, 7 adultos y 34 listeriosis perinatal, mueren 2 adultos y 16 niños. Los

	marítimas	adultos habían comido ensalada de col. La serovariedad 4b fue aislada en la casa y en la sangre de una víctima. Había listeriosis ovina en la granja y la col había sido abonada recientemente con estiércol de oveja.
1983	Boston	Entre junio y agosto, 49 casos, 42 adultos y 7 parejas madre-hijo de los que mueren 14. Atribuidos a leche pasteurizada aunque no se obtuvieron aislamientos. En 32 de 40 cultivos se encontró la serovariedad 4b. La leche procedía de una granja en la que había listeriosis en las vacas lecheras. El microorganismo fue hallado en 15 de 124 muestras de leche fresca y perteneció a la serovariedad 11, 3b, 4ab y 4b.
1983-1987	Cantón de Vaud, Suiza	Durante este período hubo 122 casos en personas. El queso blando contenía la misma serovariedad y el mismo fagotipo hallado en más del 80% de las víctimas. Una vez eliminado el queso en 1987 no se observaron nuevos casos.
1985	Los Ángeles	142 casos, de los cuales 93 eran mujeres embarazadas, El 98% de estas últimas tenía factores predisponentes conocidos; el 82% de 105 aislamientos fue de la serovariedad 4b.
1986-1987	Filadelfia	36 casos en un período de 5 meses, 16 muertes incluidos 2 recién nacidos. Se sospecha de helados, salami y hortalizas.
1987	Inglaterra	Una mujer no embarazada, inmunocompetente de 36 años contrajo listeriosis clínica a partir de un queso blando. Se aisló la serovariedad 4b en el enfermo y en el queso sobrante.
1988	Reino Unido	Una mujer dio a luz un niño muerto 5 días antes de que presentara síntomas parecidos a los de la gripe. La serovariedad 4 fue aislada en pollo y en muestras del feto fue del mismo fagotipo. Origen más probable pollo cocido refrigerado.
1988	Reino Unido	Abortó después de una enfermedad de 2 semanas. Los aislamientos del alimento y de muestras del feto fueron del mismo fagotipo. Origen probable conserva de leche puesta en frasco de cristal tres meses antes.
1988	Texas	Mujer con cáncer, hospitalizada con sepsis, provocada por <i>Listeria monocytogenes</i> . Había comido diariamente 1 salchicha Frankfurt de carne de pavo calentada en microondas. Se aisló la misma serovariedad en la enferma, en productos de su nevera y 4 meses después en la planta de fabricación de las salchichas.

(Jay 1992).

Dentro de las enfermedades transmitidas por productos alimenticios, figura la listeriosis. Es una zoonosis provocada por una bacteria del genero *Listeria* de la cual ya se tiene noticias desde 1911 en animales, detectándose en seres humanos en el año de 1929 (Food and Drug Administration (FDA) 1992). En 1926 Murray la describió como una enfermedad septicémica en el laboratorio al experimentar con conejos, la que se caracterizaba por la presencia de monocitosis periférica. (Krugman 1996)

La mayor parte de la información sobre la patogénesis de *L. monocytogenes* viene de estudios en ratones, y de estudios de biología celular usando cultivos de tejidos (FDA 2001).

A fines de la década de los 80, *Listeria monocytogenes* surgió como un problema en carnes y alimentos procesados en los Estados Unidos.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y la FDA, trabajaron en plantas para mejorar los procedimientos y establecer una tolerancia “cero” para el patógeno en productos listos para consumirse. Así, entre 1989 y 1993, la tasa de enfermedad de *Listeria monocytogenes* declinó en un 44%. Análisis preliminares desde 1993 no mostraron cambios en la tasa de enfermedad. Pero a fines de 1998 hubo un aumento del número de casos de una especie subtipo de *Listeria monocytogenes* lo que alertó al CDC (Centro de Control y Prevención de Enfermedades) y comenzaron a muestrear. A partir del 5 de febrero de ese año, el CDC reportó 16 muertes (5 de ellas abortos o partos prematuros) y 73 enfermos en 14 Estados, asociados con un brote (FSIS 2000).

## **B. Microbiología de la leche**

La microbiología está estrechamente relacionada con los sectores de la industria lechera. Los principios microbiológicos son la base de las técnicas de producción higiénica de la leche, dirigen muchos de los tratamientos para su transformación industrial y son el fundamento de los métodos de conservación de los productos lácteos. La calidad de la

leche y los productos lácteos dependen en gran parte de su microbiología y en su valoración se incluyen siempre normas microbiológicas (Amiot 1991).

El sistema de identificación utilizado se basa principalmente en las pruebas de tinción Gram, catalasa, oxidasa, fermentación de los azúcares y esporulación. Un aspecto fundamental de la calidad de la leche es su flora microbiana, desde el punto de vista cuantitativo, se considera que las leches con bajos niveles son de mejor calidad, además del número, el tipo de microorganismos presentes en la leche también influyen tanto en el aspecto higiénico como en el de la transformación. La calidad real de un producto lácteo, es el resultado directo de la variedad bacteriológica de la leche de la que procede (Amiot 1991).

Teóricamente la leche al salir del pezón debería ser estéril, sin embargo, siempre contiene de 100 a 10,000 bacterias por ml. La población media se sitúa alrededor de 1,000 pero los datos son muy variables. Durante el ordeño, las primeras fracciones de leche están generalmente más contaminadas que el resto, la leche del final del ordeño puede contener una población microbiana hasta cinco veces menor que la del inicio. Esto indica que el canal del pezón puede ser una importante fuente de contaminación. La mayor parte de microorganismos de la ubre entran por el canal del pezón. La leche procedente de animales con deformaciones de pezón o con un esfínter que cierra mal contiene un elevado número de microorganismos. El lavado y desinfección de la ubre puede disminuir por un factor de 10 la población microbiana de la leche recién ordeñada. Entre ordeño y ordeño, la ubre y los pezones están expuestos al contacto con diversos elementos del establo, el heno y la tierra. Lavando la ubre y los pezones se reduce el aporte de sedimentos, aun así con los pezones lavados pero húmedos o no secos, la contaminación bacteriana es igual que con los pezones sin lavar (Amiot 1991).

### **C. Características de *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, intracelular, facultativo, que causa infecciones graves, sobre todo en pacientes inmunocomprometidos y en recién nacidos. Las manifestaciones más frecuentes de la listeriosis son la meningitis y la

septicemia, pero la más singular de sus numerosas manifestaciones clínicas es la infección del tracto genital de la mujer grávida y las infecciones de sus hijos, ya sea antes del parto o durante el parto. Aunque su morfología es parecida a las corinebacterias, está más relacionada genéticamente con *Lactobacillus* con el cual se agrupa en la actualidad (Jawets 2002).

Su morfología es un bacilo pequeño y Gram positivo, con tendencia a presentarse en cadenas cortas de tres a cinco microorganismos. En los preparados teñidos, a menudo adopta una disposición difteroides típica en empalizada, propiedad que fue motivo de su clasificación anterior incorrecta con las corinebacterias. *Listeria monocytogenes* mide de 0.4 a 0.5  $\mu\text{m}$  por 0.5 a 2  $\mu\text{m}$ . En cultivos incubados a 37°C durante 3 a 6 horas predominan las formas bacilares, pero después la forma prevalente es la cocoide, en cultivos de 3 a 5 días de antigüedad a menudo se presenta como estructuras filamentosas largas de 6 a 20  $\mu\text{m}$  y a veces más, en especial en las colonias rugosas. A temperaturas de entre 20°C y 25 °C *Listeria monocytogenes* se mueve activamente por medio de cuatro flagelos peritricos, pero a 37°C sólo se forma un flagelo polar. La motilidad de la listeria es útil para diferenciarla de *Erysipelothrix* y de las corinebacterias (Jawets 2002).

Las necesidades nutritivas de las listerias son las típicas de muchas especies de bacterias Gram positivas. Crecen bien en muchos medios ordinarios tales como el caldo con infusión de cerebro y corazón. El caldo con soja y tripticasa, y el caldo con triptosa. Si bien, la mayoría de las necesidades nutritivas se han definido para *Listeria monocytogenes*, se cree que las demás especies del género tienen necesidades nutritivas similares. Las listerias necesitan al menos cuatro vitaminas del grupo B: biotina, riboflavina, tiamina y ácido tioctico (ácido alfa-lipóico, se trata de un factor de crecimiento necesario para algunas bacterias y para algunos protozoos), y 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. Las especies de listeria se parecen a la mayoría de los enterococos por ser capaces de hidrolizar la esculina, de crecer en presencia del 10% o del 40 % de bilis, en aproximadamente 10% de NaCl. Si bien el hierro es importante en su crecimiento in vivo, parece ser que *Listeria monocytogenes* no

posee compuestos específicos que fijan el hierro y satisface sus necesidades mediante movilización reductora del hierro libre, que se une a receptores de superficie (Jay 1992).

**Efecto del pH.** Crecen mejor en valores de 6 y 8, el pH mínimo que permite su crecimiento es de 4.1 y un valor máximo en torno a 9.6 y dentro de una escala de temperatura que va desde 1°C hasta 45°C. En general, el pH mínimo de crecimiento de una bacteria es función de la temperatura de incubación, la composición general de nutrientes del sustrato de crecimiento, la disponibilidad de agua y la presencia y cantidad de NaCl y de otras sales o de otros inhibidores.

**Efecto de la temperatura.** Se comprobó que la media de la temperatura mínima de crecimiento en agar soja tripticasa de 78 cepas de *Listeria monocytogenes* era de 1.1°C ± 0.3 °C (Jay 1992).

La inmunidad humoral es relativamente poco importante en el desarrollo de las infecciones por *Listeria monocytogenes*. Esta bacteria se puede replicar en los macrófagos y moverse dentro de las células, evitando así la eliminación mediana por anticuerpos. Por este motivo, los pacientes con defectos en la inmunidad celular y no en la inmunidad humoral son especialmente susceptibles a las infecciones graves (Zinsser 1994).

Las listerias están muy difundidas en la naturaleza, pudiéndose encontrar en la materia vegetal en descomposición, en los suelos, en las heces de los animales, en el contenido intestinal de varios mamíferos, pájaros, peces, insectos y otros animales, en las aguas residuales, en el ensilado. El hallazgo de *Listeria monocytogenes* en 11 de 12 granjas solamente durante los meses de primavera sugirió a un grupo de investigadores que la vegetación muerta es un origen de estos microorganismos, mejor que la vegetación verde o muerta recientemente. Esta especie fue hallada en cada una de las más de 50 muestras de aguas residuales, lodos residuales, y agua de río examinadas en el Reino Unido. El número de listerias halladas era con frecuencia mayor que el de salmonelas y en dos ocasiones en las muestras se encontró *Listeria monocytogenes* pero no se detectaron salmonelas. En

general es de esperar que existan listerias donde existen bacterias acidolácticas y algunas corineformes (Jay 1992).

Aunque la incidencia de portadores humanos es desconocida, se estima que del 1% al 5% de los individuos sanos son portadores fecales. Debido a que estos microorganismos son ubicuos, es probable que la exposición y la colonización transitoria ocurran en la mayoría de individuos. Varios estudios han puesto de manifiesto que existen unos 2.500 casos de listeriosis cada año en Estados Unidos. Esta estimación puede ser engañosa, puesto que se han documentado grandes brotes asociados con productos alimentarios contaminados. Por ejemplo, en un brote en 1999, se retiraron 30 millones de libras de carne contaminada. La incidencia de la enfermedad se presenta también en poblaciones de alto riesgo, como los neonatos, los ancianos, las mujeres embarazadas y los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, trasplante renal y tumores sólidos (Zinsser 1994).

Estudiando los casos de enfermedad en las personas, es evidente que este microorganismo existe en algunos alimentos. Presenta una elevada incidencia en leche cruda, carne de cerdo, carne de ave cruda, carne picada de vaca y algunas hortalizas, ver tabla # 2. En una extensa revisión de este microorganismo en diferentes tipos de carnes, observaron que ha sido hallada en la carne de vaca, de cerdo, de cordero, en embutidos, y en carnes listas para comer, así como también en aves (Jawets 2002).

**Tabla # 2 Predominio de *Listeria monocytogenes* en diversos alimentos.**

<b>Alimento</b>	<b>Incidencia*</b>	<b>Procedencia</b>
<b>Leche Cruda</b>	1% de 1,004	Alemania
	45.3% de 95	España
	4.4% de 137	Holanda
	5.4% de 315	Ontario
	12% de 121	Estados Unidos
	4% de 200	Nebraska
	4.2% de 350	Estados Unidos
<b>Helados/mezclas</b>	0.4% de 350	Canadá
<b>Quesos blandos y semiblandos</b>	0.5% de 374	1 de 14 países
<b>Carnes de vaca y cerdo picada</b>	95% de 19	Canadá

	80% de 30	Alemania
<b>Pollo crudo</b>	57% de 35 33% de 22	Reino Unido Maryland
<b>Hortalizas</b>	12.2% de 49	Taiwán
<b>Patatas</b>	25.8% de 132	Minessota

\* % por muestras analizadas

(Jay 1992).

La listeriosis humana es una enfermedad esporádica durante todo el año, aunque su pico de incidencia ocurre en los meses más calidos. Las epidemias focales y los casos esporádicos de listeriosis se han asociado con el consumo de leche contaminada, quesos poco curados, carne poco cocida (pavo, carnes frías), vegetales crudos mal lavados, especialmente col (repollo). Debido a que *Listeria* puede crecer en un amplio rango de pH, así como en temperaturas frías, los alimentos con un pequeño número de microorganismos pueden resultar con contaminados después de una refrigeración prolongada. Si la comida no está cocinada o lo está de manera inadecuada (preparada en microondas, una carne de vaca o unas salchichas de pavo) antes de consumirse, puede presentarse la enfermedad. La tasa de mortalidad de las infecciones sintomáticas por *Listeria* (del 20% al 30 %) es más alta que la mayoría de las otras enfermedades transmitidas por los alimentos (Zinsser 1994).

La listeriosis presenta muchas manifestaciones y una distribución muy irregular entre las especies animales. En caso de presentación natural, la listeriosis visceral (septicemia), con meningitis o sin ella, se observa con más frecuencia en animales monogástricos y en rumiantes jóvenes, especialmente el feto y el neonato; la forma meningoencefálica es más frecuente en rumiantes adultos (Blood y Radostits 1992).

Al principio se creía que afectaba a personas que trabajaban en contacto más estrecho con los animales (granjeros), pero cuando comenzaron a aparecer casos en zonas urbanas, las autoridades de salud se dieron cuenta que no era necesario el contacto con los animales para adquirir la enfermedad, la cual también era de carácter profesional, pues acechaba a los médicos veterinarios. La mayor parte de la información sobre la patogénesis de *L. monocytogenes* viene de estudios realizados en ratones (FDA 1992)

Al ingresar *L. monocytogenes* por vía oral a través de alimentos contaminados, que es la principal vía de transmisión, penetra por el tejido intestinal y es expuesta a las células fagocíticas del sistema inmune, cuya función es destruir patógenos invasores. Una fracción de *L. monocytogenes* puede evadir los mecanismos defensores del sistema inmune, sobrevivir y multiplicarse dentro de los fagocitos hospedantes. Protegidos en su interior o a la salida de estas células hospedantes, *L. monocytogenes* se moviliza vía circulación sanguínea o linfática hacia varios tejidos y una vez invadidos estos tejidos se multiplica en ellos. Los síntomas de la listeriosis no invasiva en personas sanas inmunocompetentes, son confundidos con los síntomas de la gripe como dolor de cabeza, letárgica, fatiga y problemas asociados con el sistema digestivo, tales como diarrea, dolor abdominal, náuseas y vómitos. Mientras que los síntomas de listeriosis invasiva puede tener un período de incubación arriba de tres meses y un amplio rango de síntomas, como septicemia, meningitis bacterial, infección del sistema nervioso central, encefalitis, endocarditis, meningoencefalitis, enfermedad neonatal, osteomielitis, peritonitis, infección pleural, neumonía, en el caso de mujeres embarazadas hay partos prematuros, abortos y calambres (FDA 2001).

Se ha sugerido que el aumento brusco de los casos de listeriosis transmitida por alimentos puede ser debido a la existencia de infecciones simultáneas producidas por algún otro microorganismo patógeno, como puede ser *Salmonella enteritidis*. La incidencia de los aislamientos humanos de este último microorganismo se comporta de manera paralela a los hallazgos de *Listeria monocytogenes* en las personas. Se ha señalado asimismo que la infección a partir del tracto gastrointestinal es favorecida por las toxinas de *E. coli* y posiblemente por el uso de antiácidos que neutralizan la acidez del estómago que, si no fuese neutralizada, inhibiría o neutralizaría las listerias (Pitt *et al.* 1999).

Estudios a partir de RNA e hibridaciones DNA-DNA han dado como resultado la división del género *Listeria* en siete especies, las cuales son *L. monocytogenes*; *L. innocua*; *L. ivanovii*; *L. seeligeri*; *L. grayi*; *L. murra*; *L. welshimeri* (Ballows 1991) De éstas, las especies *L. grayi* y *L. murra* son consideradas como subespecies de una especie simple, *L. grayi*. *L. denitrificans* ha sido clasificada en el género *Jonesia* (Bacteriological

Analytical Manual 2001).

Se sabe, que las siguientes condiciones predisponen a las personas adultas a padecer listeriosis y son importantes en la determinación del índice de mortalidad: neoplasias, SIDA, alcoholismo, diabetes, enfermedades cardiovasculares, transplantes renales y terapia con corticoesteroides. Cuando las personas adultas contraen la enfermedad, la meningitis y la sepsis son los síntomas más comúnmente advertidos. De 641 casos de listeriosis humana estudiados, el 73% de las personas afectadas padecían meningitis, meningoencefalitis, o encefalitis. La linfadenopatía cervical está relacionada con el síndrome en las personas adultas y por ello es posible que esta enfermedad se parezca a la mononucleosis infecciosa. Es posible que las mujeres embarazadas que contraen la enfermedad y sus fetos de manera congénita no presenten síntoma alguno, pero cuando los presentan son benignos y se parecen a los síntomas de la influenza. El aborto, el parto anticipado, el nacimiento de fetos muertos, son a menudo secuela de listeriosis en mujeres embarazadas. Cuando un recién nacido es infectado en el momento del parto, los síntomas de la listeriosis son los típicos de la meningitis y de modo característico se inician de la 1era a la 4ta semana después del nacimiento, si bien, se ha registrado una incubación de 4 días. En las personas adultas el período de incubación habitual tiene una duración que varía entre una y varias semanas. En los enfermos estudiados del episodio de Boston, de 20 casos, 18 presentaron bacteriemia, 8 padecieron meningitis y 13 se quejaron de vómitos, dolor abdominal y diarrea 72 horas antes de la aparición de los síntomas (Lovett *et al.* 1987).

La resistencia o inmunidad frente a los patógenos intracelulares, tales como los virus, los parásitos animales y *Listeria monocytogenes*, es mediada por las células T, linfocitos que se originan en la médula ósea y maduran en el timo. A diferencia de las células B, que producen la inmunidad humoral, las células T activadas reaccionan directamente frente a las células extrañas. Una vez que un patógeno se encuentra en el interior de la célula hospedadora, no puede ser alcanzado por el anticuerpo circulante, pero la presencia del patógeno es indicada por cambios estructurales en la célula parasitada, y las células T intervienen en la destrucción de esta célula. Los macrófagos son importantes para las actividades de las células T, para la destrucción de *Listeria monocytogenes* y

algunos otros patógenos intracelulares. En primer lugar los macrófagos fijan las células como células extrañas. Cuando las células T reaccionan con el microorganismo aumentan el tamaño y forman clonas específicas para el mismo microorganismo o antígeno. Estas células de las que se dice que están activadas, segregan interleucina 1. Conforme las células T activadas se multiplican, se diferencian para formar subclases. Las subclases más importantes de las células T para oponerse a las listeriosis son las ayudantes o CD4 y CD8, las células T de la subclase CD4 reaccionan con el antígeno extraño, y después de ello producen linfocinas, interleucina 1 e interleucina 2 e inmunointerferon o interferon-*A*. La IL2 puede aumentar la activación de las células asesinas activadas por la linfocina, que son capaces de lisar los macrófagos infectados. Una dosis insignificante de IL2 de 0.6 mg/ratón administrada desde el exterior refuerza la resistencia del ratón frente a *Listeria monocytogenes* (Jay 1992).

#### **D. Incidencia**

En Estados Unidos en la leche cruda o a granel en tanque se calculó que la concentración de listeria sp era de aproximadamente 1 ufc /ml, o menos. Mientras que en un estudio realizado en Canadá en la leche cruda se hallaron menos de  $20 \times 10^3$  ufc/ml. Se ha averiguado que el número máximo de células que elimina una vaca infectada, tanto de modo natural como de modo artificial es de aproximadamente  $10^4$  ufc/ml, se comprobó que una de las 34 muestras de leche cruda contenía mas de 6,000 ufc/ml. (Jay 1992).

#### **E. Propiedades térmicas**

A pesar que en el brote de listeriosis humana que se presentó en Massachussets en el año de 1983 (Jay 1992), en el que estuvo implicada leche pasteurizada, no se aislaron células de *Listeria monocytogenes*, se puso en tela de juicio la suficiencia de los protocolos convencionales de pasteurización de la leche. Desde 1985 se tiene en cuenta un gran número de estudios sobre la destrucción de este microorganismo en productos lácteos. Han sido determinados los valores D para algunas cepas de *Listeria monocytogenes* en leche entera y en leche desnatada (ver tabla 3). Los valores D indican que, en la leche, el protocolo de temperatura alta/tiempo corto (HTST) (71.7 C por 15 segundos), es adecuado

para reducir el número de este microorganismo normalmente existente por debajo de niveles detectables. El protocolo de la pasteurización en tanques o pasterización (LTLT) (62.8C por 30 segundos) es aún más destructor.

**Tabla # 3 Valores D y Z calculados en muestras de leche contaminada.**

NÚMERO DE MENSTRUO DE CEL/ML	DE CALENTAMIENTO	DE TEMPERATURA °C	VALOR D SEG	VALOR Z °C
10 <sup>5</sup>	Leche desnatada	71.7	1.7	6.5
10 <sup>5</sup>	Leche entera estéril	71.7	2.0	6.5
10 <sup>5</sup>	Leche entera cruda	71.7	1.9	6.0

El valor D es el tiempo de reducción o tiempo necesario para destruir el 90% de los microorganismos. Este valor es numéricamente igual al número de minutos necesarios para que la curva de supervivencia atraviese un ciclo logarítmico. El valor Z supone el incremento de temperatura necesario para reducir el valor D a la décima parte de su valor, o un ciclo logarítmico si se expresa el logaritmo de D frente a la temperatura. (Jay 1992).

#### **F. Aislamiento Y Cultivo De *Listeria Monocytogenes*.**

Se puede cultivar *Listeria* en caldos de crecimiento enriquecido tamponado, que contengan acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximida como agentes restrictivos selectivos. Después de 24 a 48 horas de incubación a 30<sup>o</sup> C, el cultivo enriquecido es sembrado en dos diferentes placas de cultivo: uno es el medio Oxford (OXA) y el otro es el agar selectivo PALCAM para *Listeria*, el cual contiene polimixina B, acriflavina, y ceftacídima, o medio litio cloridefeniletanolmoxalactam (LPM), con o sin esculina, y citrato de amonio férrico. Después de 24 a 48 horas de incubación a 30-35<sup>o</sup> C, las colonias de *Listeria* en OXA, PALCAM y LPM son blancas con un halo negro, resultante de la hidrólisis de la esculina, mientras las colonias que se desarrollaron en LPM sin esculina aparecen verde azulada bajo luz oblicua. El aislamiento presuntivo de *Listeria* está especificado y basado en una serie de pruebas bioquímicas que pueden tomar 7 días en completarse (Marth y Steele 1998).

Para impedir la flora acompañante indeseable, el medio de cultivo contiene cloruro de litio, acriflavina, sulfato de colistina, cefotetano, cicloheximida y fosfomicina como componentes inhibidores del crecimiento. *Listeria monocytogenes* disgrega la esculina presente en el medio de cultivo dando esculetina con formación de iones hierro (III), que producen compuestos complejos negros que luego tiñen de negro las colonias de *Listeria monocytogenes*. Existen otros tipos de caldos de enriquecimiento como el *caldo de enriquecimiento para Listeria (base)*, su composición consiste en Triptosa, D (+)-glucosa, cloruro sódico, tiamina dicloruro, y como aditivo contiene tiocianato potásico, que sirve para la represión de la flora Gram negativa acompañante. Este caldo va acompañado con la preparación posterior de un agar selectivo para *Listeria* que se compone de los mismos componentes anteriores, a los que se les adiciona ácido nalidíxico y Agar-agar (Merck 1994). El *caldo de enriquecimiento selectivo para Listeria FRASER (base)* tiene un elevado contenido en sustancias nutritivas y junto a su capacidad tampón se crean condiciones óptimas para el crecimiento de *Listeria*. El crecimiento de gérmenes acompañantes es inhibido en gran medida por el cloruro de litio, el ácido nalidíxico y el clorhidrato de acriflavina. Mediante la adición de esculina y citrato de amonio y hierro (III) se hace posible la identificación de la  $\beta$ -D-glucosidasa de las *Listerias*. Por la acción de la  $\beta$ -D-glucosidasa se escinde el glucósido esculina en esculetina y glucosa. La esculetina forma entonces con los iones hierro (III) un complejo verde oliva a negro. La composición del caldo es proteosa peptona, peptona de caseína, extracto de levadura, extracto de carne, cloruro sódico, hidrógenofosfato disódico, dihidrogenofosfato potásico, esculina, cloruro de litio (Merck 1994).

### III. JUSTIFICACIÓN

La importancia de este estudio radica en poder estimar un dato de prevalencia de *Listeria monocytogenes* a partir de leche cruda proveniente de fincas de la costa sur. Esta es un área, que según el Departamento de Regulación y Control de Alimentos del Ministerio de Salud Pública, puede estar en riesgo con dicha bacteria y cuentan con muy pocos estudios de la incidencia de esta bacteria en productos lácteos.

El resultado de la investigación deberá ser una muestra más de la importancia que tiene el proceso de pasteurización de leche cruda como materia prima en la producción de productos lácteos.

## IV. OBJETIVOS

### A. Generales

Determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de leche cruda en fincas productoras de la costa sur.

### B. Específicos

- Determinar la prevalencia de *L. monocytogenes* en leche cruda.
- Determinar los factores externos que predisponen la presencia de la bacteria *L. monocytogenes* en leche cruda proveniente de fincas del Departamento de Escuintla.

## V. METODOLOGÍA

El trabajo de campo se realizó en los meses de noviembre y diciembre del año 2005. Los medios de cultivo y la metodología a continuación descrita se trabajaron en el Laboratorio Nacional de Salud, entidad del Ministerio de Salud de Guatemala.

Se contactó a las personas de la Cámara de Productores de Leche, quienes proporcionaron un listado con la ubicación de los principales centros de acopio y fincas productoras de leche. Con base a esta lista y a otros contactos del sector lechero se comenzó a muestrear, recolectando en 34 fincas y no en 11 como se tenía planteado originalmente.

Para el número de muestras a recolectar, se utilizará una fórmula estadística para variables cualitativas y de distribución normal

$$N = p (1-p) z^2/e^2$$

p= prevalencia teórica (3. %)

z= para intervalo de confianza 95% (1.96)

e= el margen de error. (5 %)

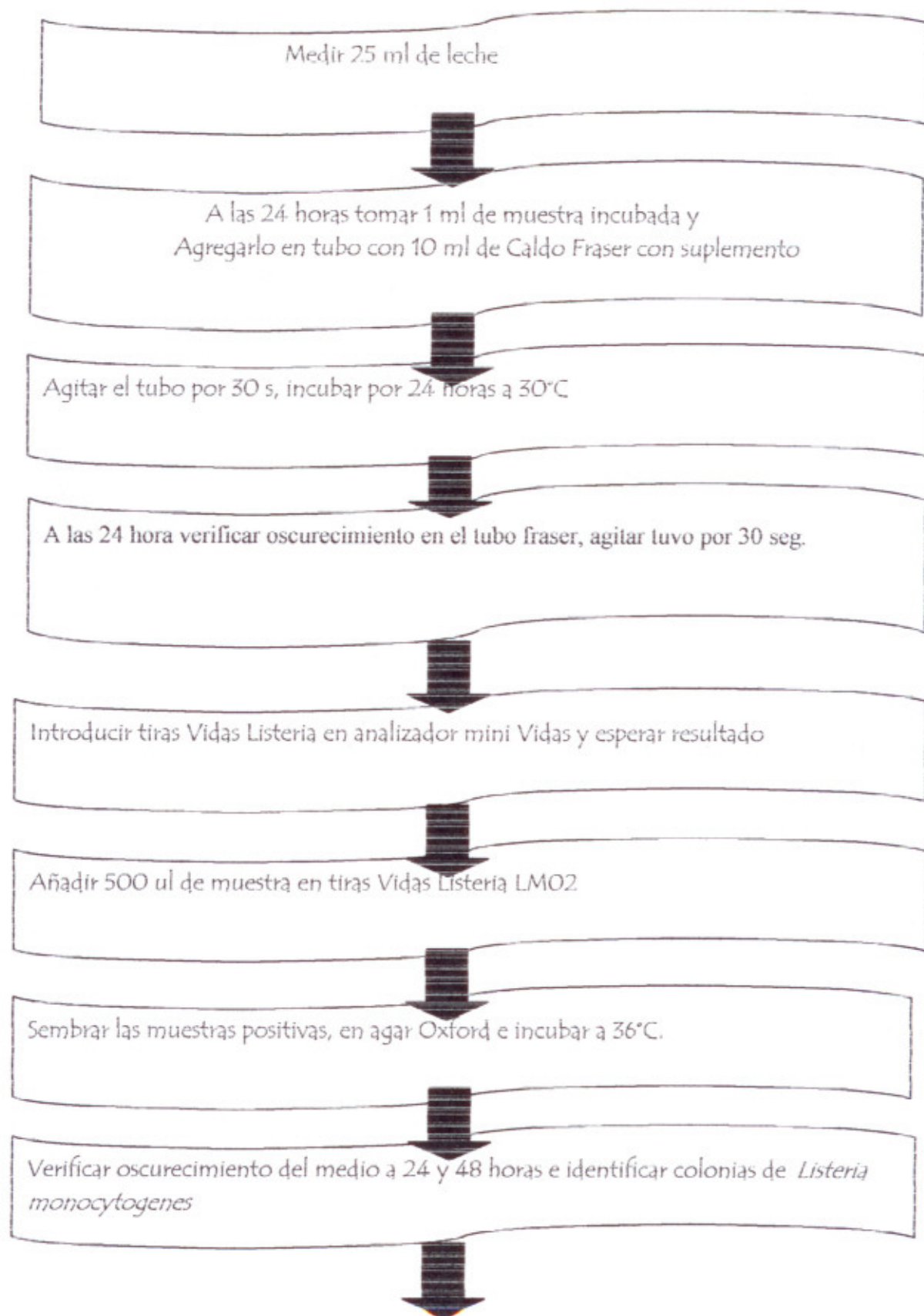
Con los valores anteriores tenemos un N = 45

### A. Toma de muestras

Para llevar a cabo la toma de muestra se llegaba a la finca durante el ordeño, o un tiempo prudencial luego del ordeño, para evitar trabajar con muestras con alta carga bacteriana.

El tiempo en el que las muestras permanecían en almacenamientos estuvo alrededor de 1 a 3 días antes de comenzar la siembra (ver anexos tabla # 1), éstas se transportaban en hieleras manteniendo la temperatura en un rango entre 4°C y 7°C, luego se mantenía en refrigeración a 4 °C aproximadamente.

Se repartieron las 45 muestras en tres semanas analizando 15 muestras por semana, y los medios a utilizar se producían una semana antes, aunque la segunda semana sólo se analizaron 8 muestras.

**B. Diagrama de flujo del método utilizado**

## Continuación del diagrama...

Seleccionar de cada caja petri de agar Oxford una colonia y sembrar en Agar ISA con extracto de levadura 5%, incubar a 36°C y esperar 24 horas.

Sembrar colonias cremosas de ISA en tubo de agua bufferada, agitar por 30 s y esperar 5 minutos para que haya turbidez en el medio

Tomar 100 ul del tubo buffer y llenar los pozos de tira de identificación Api *Listeria*. Dejar incubar en medio aerobio por 24 horas a 36 °C

A las 24 horas anotar las reacciones +/- de todos los pozos menos del primero en hoja de resultados.

Al primer poso agregarle 1 gota de reactivo ZYM, dejar reposar por 3 minutos.

La identificación se lleva a cabo a partir del perfil numérico que se compara con los descritos en la tabla de identificación (ref. 10 300, 07887k-fr-2004/11) incluida en el kit Api *Listeria*.

## VI. MATERIALES

### A. Cristalería

- Erlenmeyer (50, 250, 1000ml)
- Tubos de ensayo (Varios tamaños)
- Pipetas (0.1, 1, 5, 10ml)
- Cajas de Petri
- Probetas (100 y 1000ml)
- Recipientes termoresistentes para esterilizar
- Espátula
- Magneto
- Gradillas
- Asas bacteriológicas
- Marcador indeleble
- Papel indicador de esterilización

### B. Equipo

- Balanza analítica DENVER AC400D.
- Estufa marca Thermolyne type 1500 stir plate
- Autoclaves de Vapor Sterilemax MC10
- Mechero tipo bunsen
- Incubadora a 30°C SERIE OV19200 - THERMOLYNE
- Incubadora a 36°C Lab Line Mod 302
- Aparato analizador mini Vidas modelo Vidas 12. bioMerieux.

### C. Reactivos

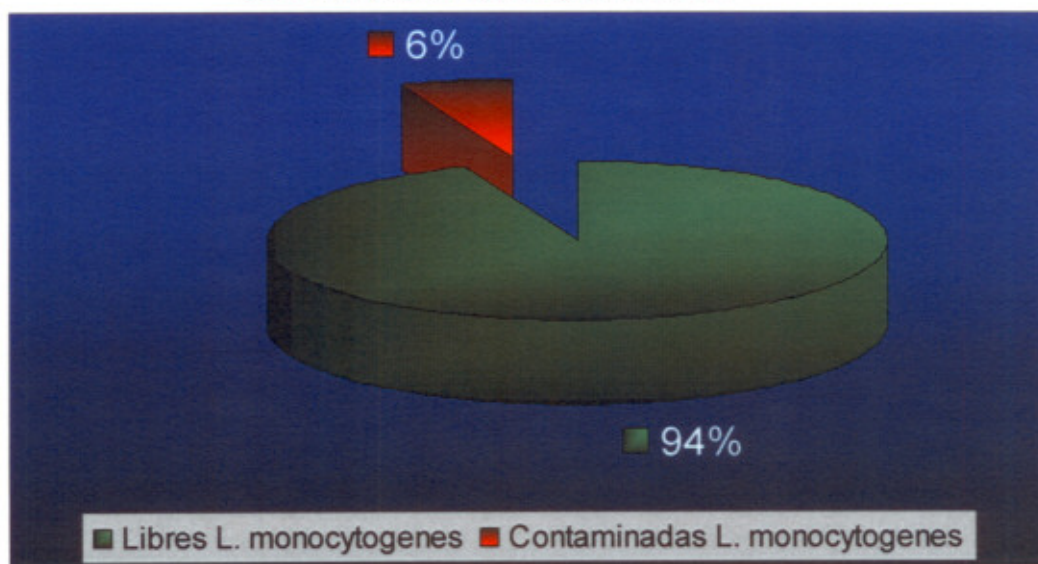
- Caldo Fraser con suplementos
- Agar Oxford
- Agar Trypticase Soya con extracto de levadura al 5%
- Agua bufferada (tubos 10 ml)
- Kit Vidas Listeria LM02
- Sistema de identificación API *Listeria*
- Caldo BHI

## VII. RESULTADOS

Se recolectó un total de 45 muestras de leche cruda, provenientes de 34 fincas del área de la costa sur. De estas muestras enriquecidas, aisladas e identificadas se encontró que, 4 muestras presentaban contaminación de *Listeria monocytogenes* pertenecientes a 2 fincas diferentes.

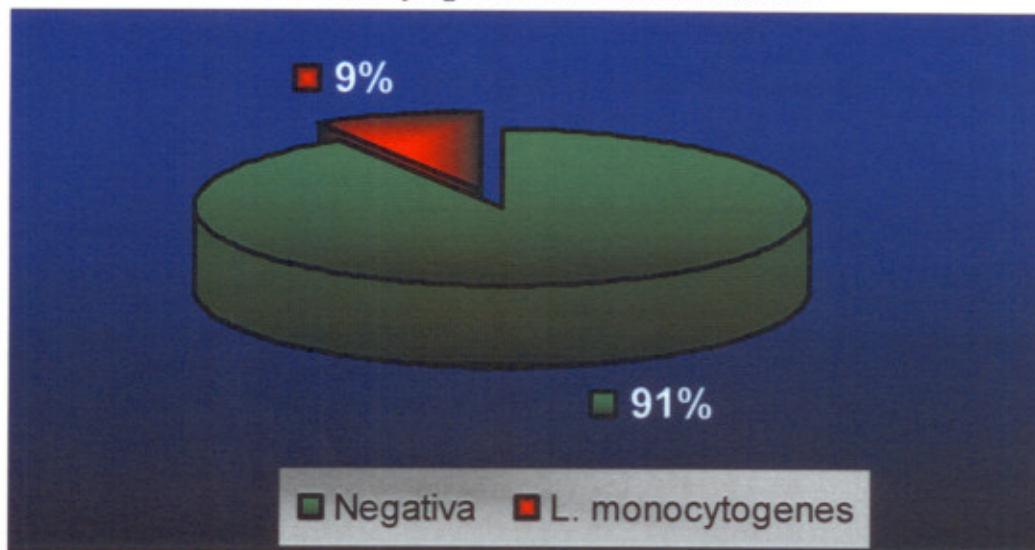
Por lo tanto se encontró una prevalencia del 6% en las 34 fincas lecheras utilizadas como universo o población.

Gráfico No. 1. Prevalencia de *L. monocytogenes* encontrada en fincas de la costa sur.



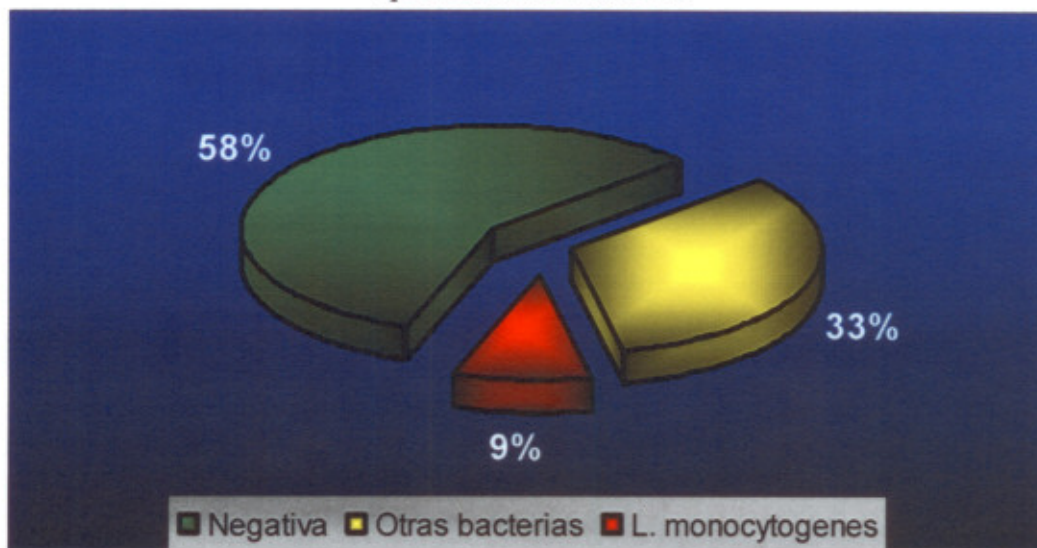
Teniendo en cuenta que el número de muestras analizadas fueron 45, de las cuales 9 muestras se tomaron en duplicado, el 91% de las muestras recolectadas se encontraban libres de contaminación por *Listeria monocytogenes* y 9% presentaba contaminación.

**Gráfico No 2** Porcentaje de muestras positivas con *Listeria monocytogenes* de las 45 recolectadas



Un 33% de muestras mostraron un cambio de coloración en el tubo Fraser luego de 24 horas (ver anexo tabla #2), lo cual es caracterizado por el oscurecimiento del medio, producto de bacterias que hidrolizan esculina con los iones ferricos presentes. Esta reacción podría haber sido causada por bacterias del género *Listeria*, pero no de la especie *monocytogenes*.

**Gráfico No 3.** Porcentaje de Bacterias que hidrolizan esculina



Todas las muestras inoculadas en Fraser se corrieron a través de mini Vidas. Este es un analizador multiparamétrico, el cual utiliza tecnología de ELFA (análisis fluorescente ligado a una enzima), presentando resultados de presencia o ausencia de la bacteria en estudio. De las 45 muestras sometidas al análisis, el mini Vidas reportó que 4 de ellas contaban con presencia de *Listeria monocytogenes*.

Las muestras con ausencia de esta bacteria se descartaron y se siguió trabajando con las 4 muestras positivas. Del tubo fraser contaminado se procedió a sembrar en agar OXFORD por 48 horas, encontrando ennegrecimiento del agar, así como colonias sospechosas con halo de color negro en cada placa. Tomando una colonia características del agar Oxford se aisló en agar TSA con extracto de levadura en placa y en tubo para crear una colonia más cremosa y limpia dejándola incubar por 24 horas a 36°C. Las colonias de TSA se sembraron en agua bufferada por separado y luego se llenaron los pocitos de las tiras de Api Listeria. Las tiras se dejaron incubar por 24 horas a 36°C. A las 24 horas se hizo la lectura de la prueba y por último se le agregó el reactivo ZYM al primer pocito del ensayo y a los 3 minutos se verificó el cambio de color de la reacción enzimática.

**Tabla No 4. Identificación Api listeria**

Componente activo	Reacciones	Negativo	Positivo	Color encontrado	Resultado
Substrato enzimático que reacciona con ZYM (	Diferenciación <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	Naranja pálido, rosa beige, gris beige	Naranja	Naranja pálido	Negativo
Esculina, citrato ferrico	Hidrólisis esculina	Amarillo pálido	Negro	Negro	Positivo
4-nitrofenil- $\alpha$ Dmanopiranosida	$\alpha$ -MANosidasa	Incoloro	Amarillo	Amari-llo	Positivo

				pálido	
D-Arabitól	Acidificación (D-ARabitól)	Rojo / rojo anaran- jado	Amarillo / amarillo anaran- jado	Amari- llo	Positivo
D-Xilosa	Acidificación (Xilosa)	Rojo / rojo anaranjado	Amarillo / amarillo anaran- jado	Rojo	Negativo
L-Rhamnosa	Acidificación (RHAmnosa)	Rojo / rojo anaran- jado	Amarillo / amarillo anaran- jado	Amari- llo	Positivo
Metil- $\alpha$ D- glucopiranosido	Acidificación (Metil- $\alpha$ D- glucopiranosido)	Rojo / rojo anaranjado	Amarillo / amarillo anaranjado	Amarillo	Positivo
D-Ribosa	Acidificación (RIBosa)	Rojo / rojo anaranjado	Amarillo / amarillo anaranjado	Rojo	Negativo
Glucosa-1-Fosfato	Acidificación (Glucosa-1- Fosfato)	Rojo / rojo anaranjado	Amarillo / amarillo anaranjado	Rojo	Negativo
D-Tagatosa	Acidificación (TAGatosa)	Rojo / rojo anaranjado	Amarillo / amarillo anaranjado	Rojo	Negativo

**Gráfico No. 4 Resultado de prueba  
Api listeria con muestra contaminada.**



**Tabla No. 5 Resultados tabulados  
a partir de la prueba Api listeria.**

-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1
6			5			1			0

El resultado obtenido en estas galerías para las muestras 31, 40, 41 y 45 dio un resultado numérico 6 5 1 0 respectivamente, el cual consultando la tabla de identificación numérica incluida en el kit de galerías Api Listeria (ref. 10 300, 07887k-fr-2004/11), coincide con la bacteria en estudio *Listeria monocytogenes*, lo que valida y confirma los resultados obtenidos en el analizador mini Vidas.

## IX. DISCUSIÓN

En este estudio se encontró presencia de la bacteria *Listeria monocytogenes*, en muestras de leche cruda del área de la costa sur en los departamentos de Escuintla y Santa Rosa.

La contaminación de la leche puede originarse a través de la alimentación de las vacas con ensilaje de baja calidad, en el cual la bacteria se multiplicó durante la maduración. También puede originarse a través de vacas con mastitis subclínica, o por presencia del patógeno en el ambiente del lugar de ordeño o sobre las superficies del área de recepción de leche en la planta lechera, entre otros factores.

En las diferentes fincas se encontró diversidad de ganado siendo la mayoría de la raza Holstein, Brahman, Jersey y los cruces de éstas. Según el área de recolección, así era el diferente tipo de ordeño, la industrialización y las normas de higiene como de alimentación con la que contaba cada finca. Se tomaron muestras tanto de ordeño manual como de ordeño mecánico.

Los resultados de los análisis bacteriológicos indican que, de las 34 fincas muestreadas productoras de leche, 2 un (6%) fueron positivas a la presencia de *L. monocytogenes*.

Al presenciar un cambio de color de las muestras en tubo Fraser, se encontró un 33% de falsos positivos, es decir bacterias que reaccionan en el medio de crecimiento, porque también hidrolizan la esculina, transformándola en glucosa y esculetina que junto al citrato férrico forman un complejo color oscuro como lo pueden ser bacterias del tipo *Enterococcus sp.* y *Streptococcus sp.* y otras Listerias como parte de la flora normal

Guatemala fue un país azotado por la tormenta Stan en el mes de octubre de 2005. Este fenómeno de la naturaleza afectó principalmente al sector agrícola. Sectores dedicados a la siembra que se encontraban en la cercanía de algún río quedaron inundados igual que los campos de pastar del ganado. Estas inundaciones generaron proliferaciones

de bacterias las cuales afectaron al ganado lechero provocando en algunos animales mastitis. En un inicio se pensó que ésto sería un factor que aumentaría la incidencia de la bacteria en el estudio.

La contaminación con *L. monocytogenes* es usualmente bajo, especialmente en productos lácteos, en ensayos de aislamiento en forma directa a agar, usualmente no se detectan, en la mayoría de casos es por la mínima cantidad de bacterias junto con un alto número de microflora competitiva presente que se hace más difícil su aislamiento (Vlaemynck y Moermans 1996)

El aislamiento de *Listeria monocytogenes* se ve afectada por el método o protocolo empleado para su crecimiento y detección entre otros (Slade 1992). Para este estudio se usó el criterio de trabajar con medios, equipo y pruebas de casas reconocidas como lo son Difco y Biomerieux, con el fin de garantizar confiabilidad en los resultados obtenidos, puesto que en estudios consultados, la mayoría de veces justifican sus resultados con base a problemas de metodología y no se logra el aislamiento de la bacteria.

La leche posee sustancias naturales antimicrobianas como la lactoperoxidasa, enzima que se encuentra en la leche de forma natural. Para que ésta se active necesita una proporción balanceada de  $H_2O_2$  por  $SCN^-$  para la actividad óptima del sistema LP, formado por la reacción de oxígeno libre y Tiocianato de Sodio, la cual posee efectos inhibitorios sobre *L. monocytogenes* (Soler 2004)

Se ha encontrado también que *L. monocytogenes* presenta mayor resistencia a las altas temperaturas como la de pasteurización, mientras mayor sea su permanencia previa en condiciones de refrigeración (Pitt *et al.* 1999), esto es un factor importante que debe tomarse en cuenta por parte de las industrias procesadoras de leche dado que la logística en las fincas, en su mayoría, es realizar dos ordeños al día, almacenar el segundo ordeño en tanque frío por un período alrededor de 18 horas y luego mezclar esta leche con la del primer ordeño del día siguiente ya que el camión de recolección pasa una vez al día.

La erradicación de *L. monocytogenes*, en ambientes de plantas dedicadas a la producción industrial de alimentos o en alimentos procesados, en su totalidad es casi imposible, por esto se sugiere implementar estrategias de control en planta como verificar la carga microbiana luego de la pasteurización, y muestrear el producto terminado.

Es por ello que países como Canadá y naciones de la Unión Europea han establecido como máximo límite de tolerancia 100 ufc/g, para alimentos sin tratamiento térmico previo al consumo, en los cuales la bacteria no pueda multiplicarse. Las autoridades sanitarias de EE.UU., en cambio, han impuesto un límite de tolerancia cero para el patógeno en todos los alimentos (Pitt *et al.* 1999), (Comisión técnica 2000). (Schobitz *et al.* 2001). En Guatemala la reglamentación de las normas COGUANOR, dentro de su normativa, no contemplan en ningún artículo, la detección o el recuento de esta bacteria en alimentos, por esta razón se utilizan los parámetros de límite de tolerancia de 0 ufc/g.

Tomando en cuenta que la leche es un alimento, consumido por sectores en riesgo de la población en general, su presencia debería reducirse al máximo en la leche cruda. Un tratamiento de pasteurización deficiente, favorecerá la sobrevivencia de *L. monocytogenes*.

La detección de *L. monocytogenes* en leche cruda constituye un peligro potencial para el consumidor dentro de los que destacan personas inmunocomprometidas, de la tercera edad y principalmente mujeres embarazadas.

## X. CONCLUSIONES

1. La prevalencia de *L. monocytogenes* encontrada en fincas dedicadas a la producción de leche de la costa sur fue de 6%,
2. De las 45 muestras recolectadas, de las cuales 9 fueron duplicados de las 34 fincas analizadas, 4 muestras (9%) presentaron contaminación por *L. monocytogenes*
3. Los factores externos que predisponen la presencia de *L. monocytogenes* son de higiene y sanitización a la hora del ordeño, en el almacenamiento y transporte el no mantener una temperatura de refrigeración
4. La presencia del patógeno en leche cruda representa un peligro potencial para el consumidor frente al hábito de consumir leche cruda o productos elaborados a partir de leches no tratadas térmicamente, los llamados productos artesanales.

## X. RECOMENDACIONES

1. Llevar a cabo un muestreo en la otra parte de la República que se dedica fuertemente a la producción de leche, como es San José Pinula, Jutiapa, Jalapa y Zacapa.
2. Realizar un recuento total de bacterias en todas las muestras recolectadas para poder tener un parámetro de la calidad de la leche y compararlo entre los diferentes métodos de ordeño y tipo de almacenamiento.
3. Utilizar el método de análisis aplicado en esta investigación ya que el protocolo seguido es preciso y durante la realización del proyecto permitió y facilitó la identificación de *Listeria monocytogenes*
4. Implementar controles de verificación en planta para garantizar la inocuidad de la leche luego de pasar por un proceso de pasteurización.
5. La utilización de nuevas prácticas de consumo como lo puede ser, evitar el consumo de leche cruda sin previo tratamiento térmico ayudara a disminuir el riesgo en la población de padecer de listeriosis.

## XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Balows, A. Hausler, W J. 1981 *Diagnostical procedures for bacterial, mycotic and parasitic Infections*. 6<sup>th</sup> edition Byred Press, Richomond VA. , 1236
2. Blood, D.C.; Radostits, O.M. 1992 *Medicina Veterinaria*. Séptima Edición. Volumen 1, Nueva Editorial Interamericana. S. A.
3. Burbano E. Cattascal *Validación de PCR para Listeria monocytogenes en leches. Normas y Calidad PUJ* 2003. (57): 39-48.
4. Burtscher C. Fall P. Wilderer P. Wuertz S. *Detection of Salmonella spp and Listeria monocytogenes in Suspected Organic Waste by nucleic Acid Extraction and PCR*. Applied and Environmental microbiology 1999; 65: 2235-2237.
5. Curiale M. Lewus C. *Detection of Listeria monocytogenes in Samples Containing Listeria innocua* Journal of food Protection 1994; 57: 1048-1051.
6. Difco, *Manual de Bacteriología*.
7. Food and Drugs Administration (FDA), Center of Food Safety & Applied Nutrition (CFSAN) 2001 *Bacteriological Analytical Manual (BAM) on line*. <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/ba,-toc.html>
8. FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition USDA/Food Safety and Inspection Service Centers for Disease Control and Prevention, 2001. *Draft assessment of relative risk to public Health for food borne Listeria monocytogenes among selected categories of ready to eats foods*. <http://www.foodsafety.gob/~dms/imsrisk.html>
9. Food Safety and Inspection Service (FSIS). *United States Department of Agriculture, Washington D. C. 2000 FSIS Strategies for Addressing Listeria monocytogenes*. <http://www.fis.usda.gov>
10. Forsgthe, S. J; P. R, Heges. 1999 *Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP*. 2da edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza España 489 pp,
11. Foster, E; et al. 1957 *Microbiología de la leche*. Editorial Herrera. S. A. Mexico, 490pp.
12. Galves, E. M. 1997 *Determinación de la contaminación por Listeria monocytogenes en quesos de producción comercial en Guatemala usando el método USDA*. Guatemala Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de ciencias químicas y farmacia.

13. Gesche, E. 1989 *Listeria monocytogenes* como causal de enfermedad transmitida por alimentos Fleirschwirtsch, Español (2): 41-48
14. Jay, J. N. 1992 *Microbiología moderna de los alimentos*. Tercera edición Editorial Acribia S. A. Zaragoza España.
15. Jawetz, E.; Melnik, J.; Adelberg, E. 2002 *Medical Microbiology*. Decimoséptima Edición Editorial El manual Moderno.
16. Krugman, S.; Katz, S, Gershom, A. 2000 *Enfermedades Infecciosas*. Octava Edición, Nueva Editorial Interamericana.
17. Marth, E.; Steele J. 1998 *Applied Dairy Microbiology*. Editorial Marcel Dekker.
18. Mayorga, M. 2004 *Presencia de Listeria monocytogenes en leche cruda de tanques de frío en lecherías y tanques comunitarios provenientes de 9 sectores de la provincia de Cautín*, IX Región Universidad católica de Temuco facultad de acuicultura y ciencias veterinarias
19. Merck 1994 *Manual medio de cultivo*
20. Organización mundial de la salud. 1966 *Higiene de la leche*. Suiza 838 pp
21. Ortega C, Noordhuizen J P T M 1995 *Manual Interactivo de Epidemiología*. Red de Epidemiología Veterinaria y Economía:
22. Pitt, W.; Harden, T, Hull, R. 1999 *Listeria monocytogenes in milk and dairy products*. The Australian Journal of Dairy Technology. 54; 49-65.
23. Rebhun, W. C, 1999 *Enfermedades del Ganado vacuno lechero*. Editorial Acribilla S.A. Saragoza, España.
24. Reyna, L. R. 2002 *Aislamiento de Listeria monocytogenes de carcasas de pollo en planta procesadora avícola*. Guatemala Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
25. SCHOBITZ, Renate, MARIN, Marcelo, HORZELLA, Mariela *et al.* PRESENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN LECHE CRUDA Y QUESOS FRESCOS ARTESANALES. *Agro sur*. [online]. jul. 2001, Vol. 29, No. 2 [citado 15 noviembre 2005], pp. 114-119. Disponible en la World Wide Web: [http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-88022001000200004&lng=es&nrm=iso](http://mingaonline.uach.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-88022001000200004&lng=es&nrm=iso). ISSN 0304-8802.
26. U.S Health and Human Services/Food and Drug Administration (FDA), 1992. *Preventing Food borne Listeriosis*. <http://www.vm.cfsan.fda.gov/~mow/FSISLIST.html>

27. Versseyre, R; 1971 *Lactologia técnica*. Editorial Acribia, Zaragoza España 643 pp.
28. Vlaemynck, G.M.; Moermans, R. 1996. *Comparison of EB and Fraser Enrichment Broths for the Detection of Listeria spp. and Listeria monocytogenes in Raw-Milk Dairy Products and Enviromental Samples*. Journal of Food Protection 59 (11): 1172-1175
29. Zinnser, W. 1997 *Zinsser Microbiology*. 20 edición. Editorial Médica panamericana S, A. Alcorta Buenos Aires.

## XII. ANEXO

**Tabla 1. Nombres de las fincas, localización geográfica, Fecha de muestreo y tipo de ordeño realizado.**

No muestra	Lugar recolecta	Fecha recolección	Tipo de Ordeño	Tanque Frío.
TI-01	Finca Los Portales / Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-02	Finca Macal / Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-03	Finca Solórzano/ Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-04	Finca Mayo / Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-05	Finca Vendoza / Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-06	Finca Molina / Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-07	Finca Abascal / Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-08	Finca Las Flores / Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-09	Finca Praisale / Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-10	Sipacate	4-12-05	Manual	No
TI-11	Finca Las Violetas / El Panal	5-12-05	mecánico	Sí
TI-12	Finca Villa Alegre / El Panal	5-12-05	mecánico	Sí
TI-13	Finca Varsovia / El panal	5-12-05	mecánico	Sí
TI-14	Finca El Porvenir / El Panal	5-12-05	mecánico	Sí
TI-15	Finca San jose / El panal	5-12-05	mecánico	Sí
TI -16	Finca El Bosque / El Cerro	9-12-05	mecánico	Sí
TI-17	Finca Las Posas / Las Posas	9-12-05	mecánico	Sí
TI-18	Finca Las Posas / Las Posas	10-12-05	mecánico	Sí
TI-19	Hacienda Portobello / Taxisco	9-12-05	mecánico	Sí
TI-20	Finca El Bosque / El Cerro	9-12-05	mecánico	Sí
TI-21	Hacienda Portobello / Taxisco	9-12-05	mecánico	Sí
TI-22	El Cerro	10-12-05	mecánico	Sí
TI -23	El Cerro	10-12-05	mecánico	Sí
TI-24	Finca Variedades	17-12-05	Manual	No
TI-25	Finca El Esfuerzo / Escuintla	17-12-05	Manual	No
TI-26	Finca Bella Vista /	17-12-05	Manual	No
TI-27	Sta Lucia	17-12-05	Manual	No
TI-28	Sta Lucia	17-12-05	Manual	No
TI-29	Patulul	17-12-05	Manual	No
TI-30	Patulul	17-12-05	Manual	No
<b>TI-31</b>	<b>La gomera</b>	<b>18-12-05</b>	<b>Manual</b>	<b>No</b>

TI-32	El Panal	19-12-05	mecánico	Sí
TI-33	Yages	19-12-05	mecánico	Sí
TI-34	Finca Argentina / La Gomera	18-12-05	Manual	No
TI-35	Finca Argentina / La Gomera	18-12-05	Manual	No
TI-36	Finca Argentina 2 / La Gomera	18-12-05	Manual	No
TI-37	Parcela / Ceiba Melia	18-12-05	Manual	No
TI-38	Finca Clemencia / La Democracia	18-12-05	Manual	No
TI-39	Tienda Concepción / La Democracia	18-12-05	Manual	No
<b>TI-40</b>	<b>Tierra nueva</b>	<b>18-12-05</b>	<b>Manual</b>	<b>No</b>
<b>TI-41</b>	<b>Tierra nueva</b>	<b>18-12-05</b>	<b>Manual</b>	<b>No</b>
TI-42	Finca Santa Mónica / La Gomera	18-12-05	Manual	No
TI-43	Finca Santa Mónica / La Gomera	18-12-05	Manual	No
TI-44	Ceiba Melia	18-12-05	Manual	No
<b>TI-45</b>	<b>La Gomera</b>	<b>18-12-05</b>	<b>Manual</b>	<b>No</b>

**Tabla # 2 Resultados de presencia de *Listeria monocytogenes*  
En tubo fraser y resultados de mini vidas**

No muestra	Coloración tubo fraser	Presencia <i>L. monocytogenes</i> (Mini vidas)
TI-01	Claro	Negativo
TI-02	Oscuro	Negativo
TI-03	Poco oscuro	Negativo
TI-04	Claro	Negativo
TI-05	Claro	Negativo
TI-06	Oscuro	Negativo
TI-07	Oscuro	Negativo
TI-08	Oscuro	Negativo
TI-09	Oscuro	Negativo
TI-10	Oscuro	Negativo
TI-11	Claro	Negativo
TI-12	Claro	Negativo
TI-13	Claro	Negativo
TI-14	Claro	Negativo
TI-15	Claro	Negativo
<i>Control</i>	<i>Oscuro</i>	<i>Positivo</i>
TI-16	Claro	Negativo
TI-17	Claro	Negativo
TI-18	Claro	Negativo

TI-19	Claro	Negativo
TI-20	Oscuro	Negativo
TI-21	Oscuro	Negativo
TI-22	Claro	Negativo
TI-23	Claro	Negativo
<i>Control</i>	<i>Oscuro</i>	<i>Positivo</i>
TI-24	Claro	Negativo
TI-25	Claro	Negativo
TI-26	Claro	Negativo
TI-27	Claro	Negativo
TI-28	Claro	Negativo
TI-29	Claro	Negativo
TI-30	Claro	Negativo
<b>TI-31</b>	<b>Oscuro</b>	<b>Positivo</b>
TI-32	Claro	Negativo
TI-33	Claro	Negativo
TI-34	Claro	Negativo
TI-35	Oscuro	Negativo
TI-36	Oscuro	Negativo
TI-37	Oscuro	Negativo
TI-38	Oscuro	Negativo
TI-39	Oscuro	Negativo
<b>TI-40</b>	<b>Oscuro</b>	<b>Positivo</b>
<b>TI-41</b>	<b>Oscuro</b>	<b>Positivo</b>
TI-42	Claro	Negativo
TI-43	Oscuro	Negativo
TI-44	Claro	Negativo
<b>TI-45</b>	<b>Oscuro</b>	<b>Positivo</b>
<i>Control</i>	<i>Oscuro</i>	<i>Positivo</i>

Tabla # 3 Cantidad y valor de productos fabricados  
año 2000 (Datos INE)

<i>Producto</i>	<i>Establecimientos que reportaron</i>	<i>Medida</i>	<i>Primer trimestre</i>	<i>Segundo trimestre</i>	<i>Tercer trimestre</i>	<i>Cuarto trimestre</i>				
Leche pasteurizada y homogenizada	4	Litros	4,964,125 1	Q. 26,806,272	5,142,268 1	Q. 27,819,669	5,167,981 1	Q. 28,010,455	5,126,635 1	Q. 27,837,626