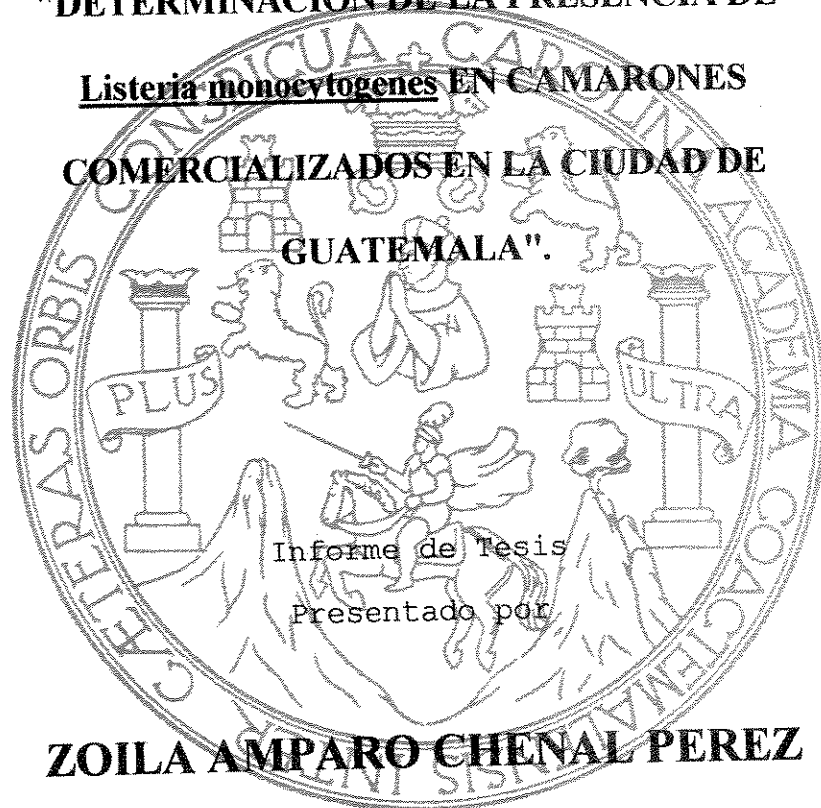


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**"DETERMINACION DE LA PRESENCIA DE
Listeria monocytogenes EN CAMARONES
COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE
GUATEMALA".**



Informe de Tesis
Presentado por

ZOILA AMPARO CHENAL PEREZ

Estudiante de la Carrera de

QUIMICA BIOLOGICA

Guatemala, enero de 1,997

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

06

T (1746)

C.4

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD
DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA
DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DE GUATEMALA

DECANO:	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR.
SECRETARIO:	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA.
VOCAL PRIMERO:	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ.
VOCAL SEGUNDO:	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN.
VOCAL TERCERO:	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE.
VOCAL CUARTO:	Br. ANA MARIA RODAS CARDONA.
VOCAL QUINTO:	Br. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA.

ACTO QUE DEDICO

A DIOS

A quien bendeciré siempre.

A LA VIRGEN MARIA

Quien con su manto protector a
guíado mi camino.

A MIS PADRES

Rafaél Augusto Chenal
Zoila Erneztina de Chenal

Para ellos todo mi amor
y agradecimiento por su
comprensión y cariño que
me han brindado.

A MIS HERMANAS

María de los Angeles Chenal de Ramírez,
Aura Violeta Chenal de Sánchez,
Alba Luz Chenal de López y
Ana Miriam Chenal de Valdés.

Por el apoyo, cariño y ejemplo que
he recibido de ellas.

A MIS CUÑADOS Y SOBRINOS

Con cariño especial.

A MIS PADRINOS

Efraín Alfaro Mijangos
Lilia Pérez de Alfaro

Dios los bendiga siempre

A MIS AMIGOS

Con especial aprecio.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres por su apoyo para la realización de mis estudios.
A ICAITI por la ayuda en el presente estudio, tanto por la asesoría profesional proporcionada como la utilización de instalaciones y el financiamiento para el desarrollo del mismo.

A la Licda. María Rosario Sandoval y a la Licda. Dinora Castro Montesinos por su asesoría y valiosa ayuda en todo momento.

Al personal del Laboratorio de Microbiología de ICAITI por su apoyo en la realización de esta investigación.

Y a todas las personas que en una u otra forma hicieron posible la realización de éste trabajo.

I N D I C E

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCION	2
3.	ANTECEDENTES	3
4.	JUSTIFICACION	14
5.	OBJETIVOS	15
6.	HIPOTESIS	16
7.	MATERIALES Y METODOS	17
8.	RESULTADOS	22
9.	DISCUSION DE RESULTADOS	26
10.	CONCLUSIONES	28
11.	RECOMENDACIONES	29
12.	REFERENCIAS	30
13.	ANEXOS	34

RESUMEN

La listeriosis es una infección que en individuos en estado de inmunosupresión produce severas manifestaciones tales como meningoencefalitis aguda y aborto séptico entre otras y es causada por la bacteria llamada Listeria monocytogenes.

En el presente estudio de investigación se determinó la presencia de L. monocytogenes en muestras de camarones que se comercializan en la ciudad de Guatemala, tanto de consumo local como los destinados a la exportación.

Se analizaron 100 muestras de camarón provenientes de puestos de mercados y supermercados locales y diferentes compañías pesqueras exportadoras de este producto, todas escogidas al azar. De cada uno de los lugares seleccionados se tomó una muestra de 4 onzas de camarón de la cual se analizaron 25 gramos.

A cada muestra se le realizaron los análisis microbiológicos de aislamiento, pruebas de identificación y confirmación para la determinación de L. monocytogenes.

Los resultados obtenidos mostraron que la frecuencia de L. monocytogenes, en los camarones comercializados en la ciudad de Guatemala es de tres por ciento y por lo tanto éste producto constituye un vehículo de transmisión de L. monocytogenes.

1. INTRODUCCION

Listeria es una bacteria considerada un contaminante ambiental y ha sido aislada del agua del mar, de ríos y de alimentos como: quesos, vegetales y carnes, así como de productos semiprocesados, constituyéndose uno de los principales problemas de la industria alimenticia.

Listeria monocytogenes es una especie reconocida como agente patógeno para humanos y animales, causa la listeriosis, una enfermedad que en ancianos, recién nacidos, individuos en estados como inmunosupresión y embarazo, produce severas manifestaciones como meningitis, meningoencefalitis y sepsis neonatal, todas, con un alto riesgo de mortalidad.

En Guatemala dentro de los alimentos marinos el camarón constituye un importante producto de consumo local debido a que es una fuente alimenticia rica en minerales y proteínas; representa una industria que ha sido desarrollada principalmente con metas a la exportación, sin embargo se cree que éste sea un vehículo de transmisión de diferentes agentes patógenos como lo es L. monocytogenes .

El presente trabajo se realizó para establecer que los camarones que se comercializan en la ciudad de Guatemala son fuente de infección de la listeriosis humana.

2. ANTECEDENTES

2.1. LA INFECCION POR LISTERIA

2.1.1 Definición

La listeriosis es una infección que afecta tanto a animales como al hombre, que se caracteriza principalmente por síntomas neurológicos y una meningoencefalitis aguda (1,2,3).

2.1.2 Agente etiológico: Listeria monocytogenes.

2.1.2.1 Características generales

El género Listeria contiene varias especies entre ellas L. grayi, L. murrayi, L. denitrificans, L. innocua y la única con importancia clínica es L. monocytogenes (1,2).

L. monocytogenes tiene una amplia distribución en la naturaleza y en una gran variedad de especies animales.

2.1.2.2 Morfología

L. monocytogenes morfológicamente es un cocobacilo grampositivo que tiene tendencia a aparecer en cadenas cortas de 3 a 5 microorganismos. En preparaciones coloreadas presentan una típica disposición difteroide. Tiene un tamaño de 0.4 a 0.5 x 0.5 a 2 um (4).

En cultivos incubados durante 3 a 6 horas a 37 °C predominan las formas bacilares, pero luego la forma prevalente es la cocoide, de 20 a 25 °C, es activamente móvil por medio de cuatro flagelos peritricos, pero a 37 °C sólo se forma un flagelo polar (2).

Macroscópicamente las colonias de L. monocytogenes muestran similar apariencia con el género Streptococcus, ya que se caracterizan por que al ser inoculadas en agar sangre presentan una zona marrón de beta hemólisis, que se observa mejor después de 24 horas de incubación (4,6).

2.1.2.3 Características Bioquímicas

La L. monocytogenes es un microorganismo aeróbio a microaerofílico ya que se ha comprobado por investigaciones que una atmósfera con un 100% de CO₂ inhibe significativamente el

crecimiento y que el número de células dañadas en condiciones anaeróbicas es mayor que en condiciones aeróbicas (7,8). Es una bacteria Gram positivo, oxidasa negativo, no esporoformadora, produce catalasa una propiedad que es útil para la diferenciación del género *Streptococcus*. Fermenta un cierto número de azúcares con formación de ácido (9).

Crece dentro de un rango de pH de 5 - 9, pero puede sobrevivir a pH ligeramente abajo de 5 por ejemplo en el queso cottage (10).

2.1.2.4 Estructura Antigénica

Se han separado las cepas de *L. monocytogenes* en cuatro grupos serológicos mayores, con uno o más serotipos en cada uno, sobre la base de sus antígenos O y H.

La caracterización de *L. monocytogenes* en algunos estudios se ha realizado aislando un total de 289 cepas aisladas de medio ambiente y animales por medio de técnicas como RAPD (random amplification of polymorphic DNA) con el fin de relacionar las fuentes de contaminación con los genotipos encontrados (11).

No se ha detectado ninguna correlación entre los diversos serotipos de *L. monocytogenes* y algún síndrome clínico en particular. Sin embargo, hay una notable diferencia en la distribución geográfica y los diferentes serotipos. En los Estados Unidos y Canadá el serotipo 4b es el predominante (12).

2.1.2.5 Determinantes de Patogenicidad:

La virulencia de *L. monocytogenes* se debe a componentes antifagocíticos presentes en la superficie celular del microorganismo y a productos solubles que son excretados durante el crecimiento bacteriano. La hemolisina es uno de ellos, que desempeña un papel importante en la patogenia de la infección, es elaborada y liberada al medio de cultivo durante el crecimiento del microorganismo, no es dializable, es termolábil y antigénica. La hemolisina de *Listeria* puede actuar durante la infección rompiendo las membranas, especialmente aquellas de las vacuolas fagocíticas y de los lisosomas (13).

No está clara la naturaleza precisa de los antígenos solubles con actividad lipolítica de la bacteria, sin embargo

existe una correlación entre la producción de hemolisina, la actividad lipolítica y la virulencia, pues todas las cepas avirulentas presentan menor o ninguna actividad lipolítica.

La virulencia puede ser determinada por actividad de dos enzimas que influyen en la virulencia de la bacteria: catalasa y superóxido dismutasa. Estudios en cultivos de L. monocytogenes revelan que la superóxido dismutasa se produce en niveles relativamente equivalentes, pero, en otras especies de Listeria presenta diferencias, sin embargo, todas presentan un patrón similar de movilidad electroforética (14), además se conoce que la producción de éstas enzimas puede ser regulada proporcionando al medio condiciones como: temperaturas de 4 °C y concentraciones altas de sal. Esto sugiere que las condiciones después de la infección pueden ser importantes colaboradores de la virulencia (13,15).

En la actualidad ha sido posible detectar tres genes principales asociados a la virulencia de L. monocytogenes por medio de la técnica de PCR y que presentan un patrón muy singular y único para ésta especie del género Listeria (16).

2.1.2.6 Componentes de Superficie

En preparados de pared celular del microorganismo se constata la presencia de factores antifagocíticos y recientemente se aisló un material tipo endotoxina. Se cree que ésta sustancia es responsable del síndrome transitorio de aglutininas frías que se observa en algunas infecciones septicémicas listéricas en humanos en el cual induce la producción de anticuerpos que pueden reaccionar con los eritrocitos del huésped causando lisis in vivo mediada por complemento. Los anticuerpos son de clase IgM. (4,15).

2.1.3 Epidemiología

2.1.3.1 Grupos de Riesgo

Particularmente grupos de alto riesgo son mujeres embarazadas, sus fetos y niños recién nacidos. Otros grupos que inclusive aumentan cada vez más su riesgo son aquellos individuos con un sistema inmune comprometido o disminuido por diferentes causas así como individuos adictos a narcóticos que manifiestan

resistencia disminuída a la infección (17).

En menor proporción, pero existen casos que reportan a individuos previamente sanos que adquieren la infección por factores desconocidos.

2.1.3.2 Dosis Infecciosa

No se conocen datos exactos acerca de la dosis infecciosa de L. monocytogenes en humanos. Sin embargo si se sabe que ésta puede estar relacionada con la susceptibilidad del huésped de contraer la enfermedad (18).

2.1.3.3 Período de Incubación

Es variable, puede ir de 3 a 70 días dependiendo del tiempo de exposición o de la dosis ingerida (17).

2.1.4 Manifestaciones clínicas

Aborto séptico, septicemia en recién nacidos y adultos, meningitis o meningoencefalitis son las mayores manifestaciones de una infección listerial (10,13).

La L. monocytogenes también es responsable y ha sido implicada en los casos de absceso cerebral, aborto y mortinatalidad, endocarditis, abscesos diseminados, peritonitis espontánea en pacientes con cirrosis e infecciones oculares y cutáneas. Es un importante agente patógeno oportunista en pacientes con patología hematológicas y malignas (3).

Existen evidencias de que las expresiones clínicas difieren de acuerdo a los grupos de riesgo, pero, no difieren al relacionar casos esporádicos y epidemias de la infección.

La listeriosis perinatal es una entidad poco frecuente, las madres portadoras de la enfermedad sólo presentan características clínicas muy ligéras. En Guatemala en 1,986 se reportó el primer caso comprobado de L. monocytogenes en un recién nacido pretérmino de 36 semanas, que nació con asfixia perinatal, desarrollando un síndrome de dificultad respiratoria, haciendo un cuadro compatible con septicemia, falleciendo a las 51 horas de vida por hemorragia pulmonar masiva, habiéndose aislado L. monocytogenes de secreción ocular y de la sangre del niño (19).

2.1.5 Estado de Portador

La existencia de un estado de portador ha sido objeto de gran especulación en las investigaciones sobre la infección, sin embargo, se ha aislado la bacteria de secreciones vaginales en mujeres asintomáticas (10).

A cerca del proceso inmunitario que se desarrolla durante la infección no se conoce todavía mucho pero si se sabe que inmunidad mediada por células es la más importante (2).

2.1.6 Tratamiento

La penicilina G o ampicilina es el tratamiento aconsejado para las infecciones por Listeria. La eritromicina y tetraciclinas también son efectivas, pero no deben usarse cefalosporinas debido a su actividad variable y penetración limitada en las meninges. En grupos de alto riesgo, como neonatos y pacientes inmunosuprimidos, se aconseja penicilina o ampicilina y un aminoglucósido como tratamiento inicial (1).

2.1.7 Fuentes de Infección

América Latina, en donde se incluye Guatemala, alberga grandes núcleos de población que vive en condiciones marginales por factores técnicos y económicos. El rápido y descontrolado incremento de la población, el deterioro del saneamiento ambiental, la pobreza e ignorancia de la población, se agregan a los factores que propician la propagación de las infecciones en los países en desarrollo (20).

L. monocytogenes es considerada un contaminante del medio ambiente y por esta razón es fácilmente encontrada en agua de ríos, mar, lagos y canales; el ciclo de infección por Listeria en el cual se ve involucrado el camarón, indica que el agua contaminada puede infectar a los peces y productos pesqueros y estos a su vez pueden infectar al humano cuando éste ingiere los alimentos contaminados y mal cocinados (21).

En 1983 en Massachusetts, una marca específica de leche pasteurizada fue implicada en 49 casos (42 eran personas inmunocomprometidas y 7 infantes) con deficiencias en la planta de operaciones y con muestras de leche positivas para la bacteria. En

1,985 en California un queso blando fue implicado en 100 casos (más de 90 fueron infantes) y la causa fue la contaminación post-pasteurización por técnicas de manipulación y empaque.

Cuando el foco de infección es la leche, la contaminación de ésta puede ser directa como consecuencia de una mastitis listérica, pues vacas asintomáticas pueden transmitir la bacteria a su leche durante varios meses constituyéndose en una amenaza de muerte para el consumidor (22).

Otros patrones de transmisión pueden ocurrir por contacto directo de piel con material contaminado, con heces fecales, tierra (10), se debe tener en cuenta que los animales domésticos son uno de los reservorios principales de la bacteria. (23).

2.1.8 Comportamiento de L. monocytogenes en los alimentos

Recientes investigaciones revelan la habilidad de L. monocytogenes para sobrevivir y crecer en algunos productos semi-procesados, por medio de inoculaciones directas y análisis a las mismas después de una semana de almacenamiento a 4°C (24), la composición de los alimentos, por ejemplo la presencia de lisozimas podrían influir en el comportamiento y sobrevivencia de la bacteria en el alimento (25).

Características como su resistencia al calor han sido estudiadas por muchos investigadores los cuales reportan que la exposición de las células de L. monocytogenes al calor, le produce un shock térmico, siempre que los tratamientos de calentamiento excedan los 5°C por cada minuto, ya que a menor escala de temperatura suelen recuperarse con gran habilidad (7).

Como muchos otros microorganismos, cuando es sometida a bajas temperaturas (-18 °C a -198 °C), sufre daños que se manifiestan en cambios de la morfología celular, liberación de micro y macroestructuras celulares y desnaturalización de las macromoléculas y se ha descubierto que tratamientos como congelamiento y descongelamiento causan daño a la pared celular, aumentando la susceptibilidad de L. monocytogenes frente a los efectos de lipasa y lisozima (26), sin embargo, su recuperación después de congelamientos no es difícil. La existencia del

patógeno en alimentos congelados enfatiza la contaminación post-proceso.

Esta bacteria tiene un rango de pH óptimo de crecimiento que oscila entre 5 - 9, sin embargo se ha recuperado a pH menor de 5, en algunos casos.

Puede afirmarse que el índice de crecimiento en mariscos es considerablemente mayor comparándolo con carne bovina o de pollo y esto se debe parcialmente a las diferencias de pH existentes en los tejidos (27), así respectivamente, dentro de los mariscos la prevalencia de L. monocytogenes es mayor en carne de cangrejos azules que en otros mariscos de un mismo hábitat (12,28). Sin embargo en la actualidad la frecuencia de L. monocytogenes es mayor principalmente en aquellos alimentos cocinados listos para consumir que evidencian que la presencia de la bacteria se debe principalmente a contaminación post-proceso.

En Lima, Perú, la incidencia de Listeria spp. y L. monocytogenes particularmente en ceviches de un restaurante durante una investigación fué aproximadamente de 75% y 9% respectivamente, lo que indica que Listeria puede sobrevivir a exposiciones de medios muy ácidos (29).

También es importante hacer énfasis de que la presencia de L. monocytogenes en agua de mar y en productos marinos evidencia que el microorganismo es halofílico y que la salinidad no afecta la recuperación del mismo (30).

De todos los productos alimenticios derivados del mar el camarón es el más susceptible a la autólisis, a oxidación e hidrólisis de las grasas por lo tanto a la putrefacción microbiana, cuando las condiciones de almacenamiento y manipulación no son las adecuadas. Para contrarrestar esto los preservantes son la herramienta ideal. Sin embargo, métodos asépticos de manipulación y almacenamiento pueden reducir la contaminación de los mariscos pero son difíciles de aplicar debido a que la contaminación es masiva previo a el procesamiento y durante el procesamiento.

Generalmente la falta higiene de en los barcos, en las redes y todo equipo en la planta y los residuos de tierra arrastrados por el aire, luego éstos son trasladados a otros productos pesqueros al

ser sometidos a procesamientos como lavado con técnicas y soluciones no adecuadas, pelado y descabezado en las plantas recolectoras y distribuidoras de éstos productos (38).

2.1.9 Aislamiento de L. monocytogenes en los alimentos

El aislamiento de Listeria spp. de alimentos es complicado y los métodos usados para esta detección pueden variar considerablemente.

Sin embargo la presencia de L. monocytogenes ha sido detectada en una variedad de alimentos, por ejemplo quesos (6), en la leche cruda (31) y pasteurizada (32), en vegetales crudos (33), en productos pesqueros procesados listos para consumir como pescado ahumado, cangrejo, ostras y camarones (12,17), en el brote ocurrido en el sur de California en 1,985 el alimento implicado fué leche pasteurizada (29). Todos estos aislamientos demuestran la resistencia de Listeria para sobrevivir y crecer bajo diferentes condiciones.

A consecuencia de esto la Seafood Working Group of the National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) en 1991, en un debate, discutió sobre la verificación de criterios microbiológicos para la integridad de un producto alimenticio, y determinó que la presencia de L. monocytogenes en alimentos es indeseable en todo momento, debido a que es la causa primaria de los brotes epidémicos de listeriosis y que este criterio debe ser utilizado por toda la cadena de producción, distribución y venta de alimentos (34).

Para el aislamiento de la bacteria en el laboratorio, la muestra debe ser representativa, recolectada y manipulada asépticamente y debe mantenerse congelada hasta que se hagan los cultivos principalmente los mariscos, que son alimentos proteínicos muy putrescibles y que no pueden conservarse por mucho tiempo (21,35).

Generalmente se usa un caldo enriquecedor en alimentos que ofrezca protección a las bacterias y que proporcione un enriquecimiento apropiado para períodos de incubación relativamente cortos, un enriquecimiento secundario ayudará a seleccionar la bacteria específica en cuestión (36, 37).

Después de la incubación se transfiere un inóculo a medios selectivos y se incuba a las temperaturas y tiempos apropiados.

Se examinan las placas para determinar la presencia de la bacteria, según las características típicas de la colonia (38).

2.1.10 Identificación de L. monocytogenes en el laboratorio.

Entre las pruebas que ayudan a la identificación de L. monocytogenes se tienen las siguientes:

2.1.10.1 Serotipificación de L. monocytogenes

2.1.10.2 Identificación bioquímica de L. monocytogenes (39,40).

2.1.10.3 Pruebas confirmatorias, técnicas rápidas que proveen en una reacción singular la confirmación de la bacteria, (41).

2.2. EL CAMARON

2.2.1. Aspectos generales

Los camarones pertenecen al reino animal y se clasifican de la siguiente manera: Subfilum Mandibulata, clase Crustácea, subclase Malacostraca, superorden Hoplocárida, orden Estomatopoda (42,43).

Se conocen 2,500 especies, pero menos de 300 son un valioso alimento humano y de interés económico, sin embargo, 100 constituyen la pesca de camarón mundial anual (43).

La mayoría de especies marinas ocupan aguas poco o moderadamente profunda, se han encontrado algunas a profundidades cerca de 5,700 metros, sin embargo casi todo el camarón comercial es capturado en los esteros continentales a profundidades menores de 100 metros (44).

El cuerpo de los camarones es alargado y aplanado en sentido dorsoventral. Viven entre las algas, pastos marinos, debajo de las rocas y conchas, en agujeros y rocas. Toleran ambientes con 35.75 - 36.50 ‰ de salinidad, temperatura de 16 - 31 °C y fondos de fango y arena (45).

Es importante mencionar que la disponibilidad de alimento

es vital y por lo general los estuarios son muy productivos. El camarón aprovecha todo tipo de alimento disponible en el fondo, incluyendo detritus, algas y microorganismos que lo habitan(45).

Las camaroneras más grandes del mundo son las explotadas por los pescadores cubanos, mexicanos y norteamericanos en el Golfo de México (43).

Las especies más frecuentemente capturadas en las playas de Guatemala son: Penaeus aztecus, Penaeus stylirostris, Penaeus vannamei y Penaeus occidentalis (44).

La permanencia de los camarones en la áreas estuarinas dura entre 3 y 4 meses según la especie y las condiciones ecológicas. Después de éste período y al alcanzar su talla inician su migración hacia aguas marinas donde alcanzaran la madurez, cerrando su ciclo de vida (50).

2.2.2 Microbiota del camarón

Los camarones contienen los microorganismos del medio en que viven que es influenciado por la localización geográfica del lugar de captura, además de los contaminantes que se les agrega al capturarlos y manipularlos (43). Sin embargo también pueden influir características del agua como variaciones de salinidad, temperatura, materia orgánica y calidad encontrada en el área. Resultados de una investigación acerca de la microbiota de camarones café (Penaeus aztecus) presentaron cambios según el mes del año (45).

La mayor parte de la carga bacteriana normal se cree que se encuentra en la cabeza o cefalotórax. La parte exterior de los camarones contiene poblaciones de bacterias psicotróficas Gram negativo, en una proporción aproximadamente de 10 a 10 bacterias por centímetro cuadrado. En el canal alimentario, este número puede llegar a 10 bacterias por gramo de contenido intestinal.

Entre las bacterias Gram positivo está el género Micrococcus y Corynebacterium. Entre las bacterias Gram negativo predominantes pertenecen a los géneros Pseudomonas, Acinetobacter, Moraxella, Flavobacterium, Vibrio y Proteus, en el canal alimentario, estas alcanzan un número de 10 bacterias por gramo de contenido intestinal (46, 47).

Debe contener pocas bacteria coliformes, o ninguna, y absolutamente ninguna Salmonella, Shigella, y otro patógeno entérico, ya que no forma parte de su microbiota ni de su medio, su presencia indica que ha habido contaminación, posiblemente debido a la manipulación a la que son expuestos durante su procesamiento (48).

Muchos de los microorganismos encontrados en los camarones, tales como: E. coli y Enterococcus faecales, que no forma parte de la microbiota de mariscos, son clasificados como contaminantes bacterianos utilizados como indicadores de falta de higiene de los alimentos, con la posible presencia de algún patógeno (49).

Los mariscos de calidad deben de contener menos de 10 bacterias por centímetro cuadrado o por gramo de tejido a la temperatura de 20 °C, menos de 10 por gramo de coliformes fecales, así como de V. parahemolyticus. No deben contener patógenos tales como Salmonella, Shigella, V. cholerae u otro (50).

3. JUSTIFICACIONES

Los países importadores de productos marinos exigen para la aceptación de éstos, un control microbiológico sabiendo que dichos productos son una fuente potencial de infecciones alimentarias, sin embargo, el control microbiológico realizado no incluye una prueba que evidencie la presencia de L. monocytogenes en dicho producto.

Aunque existen estudios en los que se cita el aislamiento de bacterias patógenas a partir de productos marinos de consumo local, en éstos no se realiza un control microbiológico como medida de seguridad para el consumidor.

En Guatemala el camarón constituye un alimento importante por su valor nutritivo y es altamente consumido por la población crudo o mal cocinado, lo que se agrega a los factores que contribuyen a la propagación de las infecciones.

4. OBJETIVOS

4.1. General:

Aportar conocimientos sobre la calidad microbiológica del camarón que se comercializa a nivel nacional e internacional en la Ciudad de Guatemala.

4.2. Específico:

Realizar una investigación microbiológica en muestras de camarón comercializadas en algunos puntos de la Ciudad de Guatemala con el fin de determinar la presencia de L. monocytogenes.

5. H I P O T E S I S

Los camarones que se comercializan en la Ciudad de Guatemala constituyen un vehículo de transmisión de L. Monocytogenes.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1. UNIVERSO Y MUESTRA

6.1.1 Universo de trabajo

El universo o población de trabajo estuvo comprendido por camarón que se comercializa en la Ciudad Capital, incluyendo el de exportación y de consumo a nivel local.

6.1.2 Muestra y unidad de observación

Se realizó un muestreo al azar, seleccionando un total de 100 muestras: 50 muestras de camarón de consumo interno (supermercados, mercados y otros) y 50 muestras de consumo externo (compañías pesqueras).

El investigador desconoce los nombres de los sitios donde se muestreó debido a que ésta es información confidencial de la Institución donde se realizó la investigación.

6.2. RECURSOS

6.2.1 Recursos humanos

Investigador: Amparo Chenal Pérez

Asesor: Licenciada María Rosario Sandoval

Co-Asesor: Licenciada Dinora Castro Montesinos.

Personal Profesional y Técnico de ICAITI.

6.2.2 RECURSOS INSTITUCIONALES

La parte práctica de la presente investigación se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Microbiología del Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial. (ICAITI), y el apoyo financiero proporcionado por el mismo.

6.2.3 Recursos Físicos

6.2.3.1 Medios de Cultivo (anéxos)

- Medio de Universidad de Vermont (UVM);
- Fraser caldo;
- Medio Oxford Modificado (MOX)
- Prueba de Camp en agar
- Caldo para la Fermentación de Carbohidratos

- Agar Sangre de Caballo (HL)
- Agar Bilis Esculina
- Caldo de Infusión Cerebro Corazón
- Medio Basal de Oxidación y Fermentación
- Caldo Nitratado
- Rojo de Metilo
- Voges Proskauer

6.2.3.2 EQUIPO

- Microscopio
- Autocláve
- Incubadoras
- Balanza
- Refrigeradora
- Licuadora
- Centrífuga
- Potenciómetro
- Campana de flujo laminar
- Bomba de vacío
- Baño de María
- Termómetros
- Mecheros

6.2.3.3 CRISTALERIA

- Cajas de Petri
- asas de Nicromo
- tubos de ensayo con rosca
- gradillas microbiológicas
- Beakers
- Erlenmeyers
- pipetas automáticas
- probetas.
- Kitazatos
- Filtros

6.2.3.4 Reactivos

- Peróxido de hidrógeno
- Solución alfa naftol

- Hidróxido de Potasio
- Indicador rojo de metilo
- Soluciones para reducción de nitratos

6.3. PROCEDIMIENTO

6.3.1 Peso de la muestra

La muestra seleccionada deberá tener un peso de 25 gramos mínimo.

6.3.2 Preparación de la muestra

6.3.2.1 Desinfección del paquete de muestra

Purificar el paquete por fuera con una torunda de algodón conteniendo una solución de Peróxido de Hidrógeno al 3 %. Agregar una cuchara llena de Shampoo Johnson'S para bebé, ya que por contener EDTA estabilizará el peróxido.

La segunda forma de desinfectar el paquete es con una solución blanqueadora casera, agregando 50 ml de blanqueador casero, 0.5 g de Tween 80 a 1000 ml de buffer de fosfato diácido de sodio y ajustando el pH a 6.0.

6.3.2 Enriquecimiento

6.3.2.1 Enriquecimiento Primario: Agregar a 225 ml de UVM 25 g

de muestra, homogenizar durante 2 minutos e incubar a 29 °C durante 20 - 24 horas.

6.3.2.2 Enriquecimiento Secundario: Transferir 0.1 ml del incubado a el medio FB. Incubar a 35 °C durante 26 +/- 2 horas. Comparar el color de un tubo no inoculado con un tubo muestra, la aparición de un color negruzco que resulta por la hidrólisis de la esculina se interpreta como sospechoso, si por el contrario el tubo mantiene su color original se reporta como negativo para L. monocytogenes.

Luego introducir un hisopo estéril dentro del tubo FB sospechoso y sembrar en placas de agar MOX de la siguiente forma: Hacer una descarga en la mitad de la placa y en el resto hacer dos veces un rayado que sean perpendiculares a el primero formando un ángulo de 90° (Anexo No). Incubar las cajas a 35

°C durante 24 - 48 horas.

6.3.2.3 Evaluación de las cajas de agar MOX.

El agar MOX es altamente selectivo para las colonias de L. monocytogenes, las cuales presentan una forma y tamaño muy típicos, tienen un tamaño aproximado de 1 mm de diámetro, secas y con una zona negra alrededor como resultado de la hidrólisis de la esculina.

6.3.2.4 Siembra de colonias sospechosas en agar sangre de caballo

Picar cinco colonias sospechosas de Listeria, y rayar suavemente sobre las placas de agar sangre de caballo, cuidando de no romperlas. Incubar a 35 °C durante 24 horas.

Para la evaluación de las placas, se deben seleccionar las colonias translúcidas, con un diámetro de 1 - 2 mm., con una zona de beta hemólisis alrededor de la colonia.

6.3.2.5 Pruebas precedentes a la confirmación

Las colonias sospechosas de L. monocytogenes deberán ser transferidas a Caldo de BHI y a Bacto Motility Test Medium e incubar 24 y 72 horas respectivamente ambos a temperatura ambiente.

Para su evaluación se debe observar el crecimiento tipo sombrilla en medio para movilidad y además realiza una observación al microscopio en lámina en gota de caldo BHI para visualizar la movilidad tipo fribilación y una coloración de Gram para verificar el tipo de bacteria.

6.3.2.6 Pruebas de identificación y confirmación

Los medios usados en la identificación y confirmación de L. monocytogenes pueden ser inoculados a partir de caldo BHI.

Se debe inocular el sland de agar BHI para la realización de las pruebas de catalasa y oxidasa. Además se debe inocular los siguientes medios: agar bilis esculina, medio MR-VP, medio O/F, caldo nitrado y caldos para fermentación de azúcares: xilosa, ramnosa y manitol.

6.4. DISEÑO DE INVESTIGACION

6.4.1. Diseño de mustreo

El número de muestra "n", se obtuvo de:

$$n = \frac{NC^2 \sigma^2}{\Delta^2} \quad \text{donde,}$$

NC es el nivel de confianza, el cual será de 95%, obteniendo un valor teórico de 1.96 tomado de los valores de Z;

σ representa la Varianza, dada por $\sigma = pq$, donde:

p = Proporción de Casos buscados, y q = 1-p = Proporción de Casos no buscados, suponiendo una relación del 50% para cada caso, obtuvimos un valor de: p = 0.5 y q = 0.5, por tanto, tenemos:

$$\sigma = pq = (0.5 \times 0.5) = 0.25.$$

Δ representa el Limite de error permitido, este será de un 10% (0.10). Con dichos valores obtuvimos nuestra "n", la cual fue de 97.

Se analizaron 100 muestras provenientes de puestos de mercados, supermercados y compañías exportadoras de camarón en la ciudad de Guatemala, seleccionadas totalmente al azar.

6.4.2 Análisis Estadístico

Debido al tipo de investigación, el análisis de los datos se efectuará mediante estadística descriptiva.

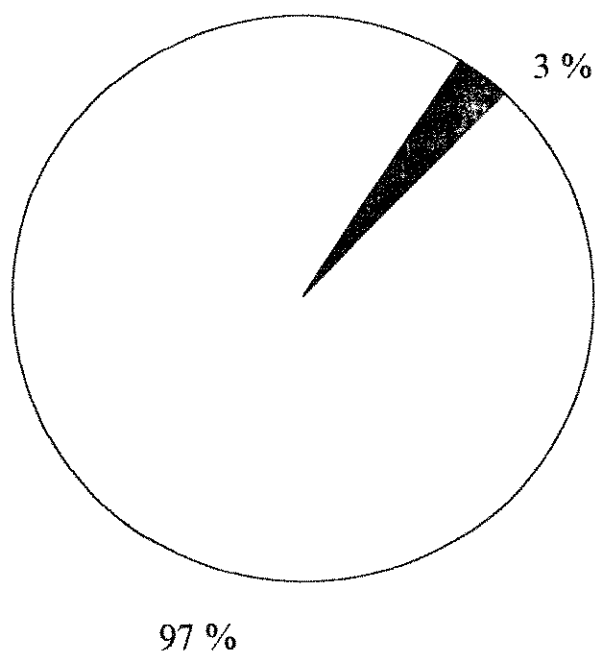
7. RESULTADOS

Mediante los recursos y procedimientos empleados, se determinó la presencia de L. monocytogenes en tres muestras de las 100 que fueron analizadas (3 %).

En las tablas se presentan los resultados obtenidos de las cien muestras analizadas, identificadas según el código utilizado como número de muestra ya que el investigador desconoce los lugares donde se obtuvieron las muestras por ser información confidencial de la Institución donde se realizó la investigación. El 97% de las muestras analizadas no presentaron crecimiento de colonias sospechosas en el agar selectivo, por lo que se reportaron negativas para L. monocytogenes.

Al 3% restante se les realizaron las pruebas de confirmación e identificación de L. monocytogenes los cuales se presentan en las siguientes tablas.

Determinación de *L. monocytogenes* en camarones comercializados en la ciudad de Guatemala.



PRUEBAS DE CONFIRMACION PARA LA
DETERMINACION DE
L. monocytogenes

No. Mx.	MOVILIDAD		GRAM
	AGAR	GOTA	
48	+	+	bacilos gram positivo
63	+	+	bacilos gram positivo
79	+	+	bacilos gram positivo

PRUEBAS DE CONFIRMACION PARA LA
DETERMINACION DE
L. monocytogenes

No. Mx.	CATALASA	OXIDASA	BILIS ESCULINA	MR-VP	O-F	REDUCCION NITRITOS	XILOSA	RAMNOSA	MANITOL
CEPA CONTROL POSITIVO	+	-	+	+/+	+/+	-	-	+	-
48	+	-	+	+/+	+/+	-	-	+	-
63	+	-	+	+/+	+/+	-	-	+	-
79	+	-	+	+/+	+/+	-	-	+	-

8. DISCUSION DE RESULTADOS

Se eligió determinar la presencia de L. monocytogenes en camarones debido a que este alimento ha sido incriminado como uno de los principales transmisores de agentes halofílicos patógenos en nuestro país (43).

El método por medio del cual se determinó la presencia de L. monocytogenes fue cuidadosamente analizado antes de su utilización, a través de un ensayo en el que muestras de camarón fueron contaminadas *in vitro* donde la recuperación de L. monocytogenes fue tanto en las primeras como en las últimas diluciones, donde también se recuperó, lo que indicó que el método podía ser aplicado en ésta investigación.

Se analizaron 100 muestras de camarón provenientes de diferentes puestos de mercado, supermercados y compañías exportadoras escogidas totalmente al azar. De todas las muestras 3% de ellas fueron positivas para L. monocytogenes lo que evidencia que los camarones comercializados en la ciudad de Guatemala son fuente de transmisión de la Listeriosis humana. Por lo que la población está constantemente expuesta a adquirir la infección si se dan las condiciones para ello.

Es importante el hecho que todo producto pesquero es manipulado desde su captura y en toda la cadena de distribución hasta que llega al consumidor y es muy difícil tener un control estricto que reúna las condiciones higiénicas adecuadas para evitar su contaminación (38).

La observación de los lugares de muestreo concuerdan con lo que reporta la literatura a cerca de que el camarón de consumo local no reúne las condiciones adecuadas de almacenamiento (38), ya que, no en todos los puestos tienen una refrigeración adecuada, sino únicamente los almacenan en cajas de lata con trozos de hielo, en las que se coloca el producto que no se vende durante el día. Al día siguiente la consistencia del camarón no es la misma, lo que baja la calidad del producto (39), que se demuestra en este estudio evidenciando la presencia de L. monocytogenes en dicho producto.

Sin embargo no en todos los expendios muestreados se observaron condiciones higiénicas inadecuadas, por el contrario éstas son bastante aceptables, sin embargo, debido a las características de L. monocytogenes, como lo es su sobrevivencia aún bajo temperaturas extremas (26), trae como consecuencia que la recuperación de la bacteria sea alta a pesar de practicar buenas medidas higiénicas.

Las muestras de camarón que fueron adquiridas de distribuidores directos, es decir, de pesca reciente y que no habían sido sometidos a manipulaciones no evidenciaron contaminación por L. monocytogenes.

Debido a que dos de las muestras positivas para L. monocytogenes son compañías pesqueras se demuestra que el procesamiento del producto pueda ser la fuente de contaminación en dichos casos, sin embargo, en este estudio no se investigaron todos los puntos críticos de contaminación en una compañía de procesamiento de mariscos destinados a la exportación por lo que esto puede ser un antecedente para la realización de estudios posteriores.

9. CONCLUSIONES

9.1 Los camarones que se comercializan en la ciudad de Guatemala, constituyen un alimento de riesgo en la transmisión de L. monocytogenes, agente causal de la listeriosis humana.

9.2 Es necesario realizar de rutina pruebas de determinación de L. monocytogenes en el camarón que se comercializa en la Ciudad de Guatemala.

10. RECOMENDACIONES

- 10.1 Educar a la población sobre el conocimiento de L. monocytogenes como contaminante de alimentos y las consecuencias a las que ésto conduce.
- 10.2 Realizar otras investigaciones que determinen la o las técnicas adecuadas para la eliminación de L. monocytogenes de los alimentos.
- 10.3 Sugerir a autoridades competentes a cerca de la realización de un estricto control de calidad microbiológico de el camarón, especialmente el camarón de consumo local.
- 10.4. Realizar estudios que establezcan los puntos críticos en empresas procesadoras de camarones, para tomar las medidas correspondientes y para demostrar la urgente necesidad de realizar pruebas que determinen la presencia de ésta bacteria en el producto.

11. REFERENCIAS

- 11.1. Joklik, W.K., Willett, H.P. y Amos, Bernard. Zinsser Microbiology. 18a., Buenos Aires, Medica Panamericana, 1984. 1,454 p. (p.614-620).
- 11.2. Jawetz, Ernest, Melnick, J.L. y Adelberg, E.A. Microbiología Médica. 12ava., México, El Manual Moderno, c 1,987. 636 p.(p.281,282).
- 11.3. Pelczar, J.M., Reid, R.D. y Chan, E.C., Microbiología. 4a., México, McGraw-Hill, c 1,982. 826 p. (p.576,579).
- 11.4. Joklik, W.K., Willett, H.P. y Amos, Bernard. Zinsser Microbiology. 18a., Buenos Aires, Médica Panamericana, c 1,984. 1,454 p. (p.618-620).
- 11.5. Boyd, R.F. y Hoerl, B.G. Basic Medical Microbiology. 2a., United States, c 1,977. 765 p. (p.378-379).
- 11.6. Garzaroli, C. y Rondinini, G. Study on Quantitative Determination of Listeria spp. in Dairy Products. Lehenson. Wiss. Technol., 25:158-161, 1,992.
- 11.7. Kim, K.T., Murano, E.A. y Olson, D.G. Heating and Storage Conditions Affect Survival and Recovery of Listeria monocytogenes en Ground Pork. J.Food Prot, 59:30-33, 1,1994.
- 11.8. Hudson, J.A. Growth of L. monocytogenes on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmosphere-packaged sliced coast beef. J. Food Prot., 57:66-70, Mar. 1,994.
- 11.9. Jawetz, Ernest, Melnick, J.L. y Adelberg, E.A. Microbiología Médica. 12ava., México, El Manual Moderno, c 1,987. 636 p. (p. 281).
- 11.10. Reed, G.H. Foodborne Illness (Part 10) Listeria monocytogenes. Dairy, Food and Environmental Sanitation., 14:482-483, Agosto 1,994.
- 11.11. Lawrence, L.M. y Gilmour, A. Characterization of Listeria monocytogenes Isolated Enviroment by Random Amplification of Polymorphic DNA and Multilocus Enzime Electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 6:2139-2144, Jun.1, 995.
- 11.12. Estela, L.A., Sofos, J.N. y Flores, B.B. Bacteriophage Typing of Listeria monocytogenes Cultures isolated From Seafoods. J. Food Prot., 55:13-17, Enero 1,992.
- 11.13. Joklik, W.K, Willett, H.P. y Amos, Bernard. Zinsser Microbiology. 18a., Buenos Aires, Médica Panamericana, 1,984. 1,454p. (p.614-620).

- 11.14. Pedras, J.A. and Deneer, H.G. Expression of Superoxide Dismutase in Listeria monocytogenes. Applied and Environmental Microbiology. 7:2360-2366. Jul.1, 1994.
- 11.15. Myers, E.R. and Martin, S.E. Virulence of Listeria monocytogenes Propagated in NaCl Containin and Media at 4°C, 25°C and 37°C. J. Food Prot., 57:475-478, Junio 1994.
- 11.16. Cooray, K.J., et al. Detection of Multiple Virulence-Associated Genes of Listeria monocytogenes by PCR in Artificially Contaminated Milk Samples. Applied and Environmental Microbiology. 8:3023-3026. Agosto 1994.
- 11.17. Reed, G.H. Foodborne Illness (Part 10) Listeria monocytogenes. Dairy, Food and Environmental Sanitation., 14:482-483, Agosto 1, 1994.
- 11.18. Garzaroli, C. y Rondinini, G. Study on Quantitative Determination of Listeria spp. in Dairy Products. Wiss Technol., 25:158-161, 1992.
- 11.19. Gini, G. et al. Listeriosis en Guatemala. Reporte del primer caso de listeriosis neonatal. Guatemala Ped. 8:67-72, 1986.
- 11.20. Massanet de Ramirez I. Estudio Comparativo entre camarones de exportación y camarones de consumo local. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 1,980. 83p.
- 11.21. Dillon, R.M. y Patel, T.R. Listeria in Seafoods: A review. J. Food Prot. 55:1009-1015, Dic. 1, 1992.
- 11.22. Rodriguez, J.L. et al. Incidence of Listeria monocytogenes and other Listeria spp. in Ewes Raw Milk. J. Food Prot., 57: 571-575, Julio 1, 1994.
- 11.23. Siragusa, G.R., Dickson, J.S. y Daniels, E.K. Isolation of Listeria spp. from feces of feedlot cattle. J. Food Prot., 56:102-105, Feb. 1, 1993.
- 11.24. Rainaldi, L., Luciani, M.A. and Picconi, F. Behavior of Listeria spp. in Meat Products. J. Food Sci. 4:291-296, 1991.
- 11.25. Kihm, D.J. et al. Sensitization of Heat-Treated Listeria monocytogenes to Added Lisozyme in Milk. Applied Environmental Microbiology. 10:3854-3861. Oct. 1994.
- 11.26. El-Ketz, S.E. and Marth, E.H. Freezing of Listeria monocytogenes and Other Microorganisms: A Review. J. Food Prot. 55:639-648, Agosto 1, 1992.

- 11.27. Shineman, T.L. and Harrison, M.A. Growth de Listeria monocytogenes on Different Muscle Tissues. J. Food Prot., 57:1057-1062, Dic. 1, 994.
- 11.28. Degnan, A.J., et al. Evaluation of Lactic Acid Bacterium Fermentation Products and Food-Grade Chemicals To Control Listeria monocytogenes in Blue Crab (Callinectes sapidus) Meat. Applied and Environmental Microbiology. 9:3198-3203. Sept. 1994.
- 11.29. Dillon, R.M. and Patel, T.R. Listeria in Seafoods: A Review. J. Food Prot., 55:1009-1015, Dic. 1, 992.
- 11.30. Beumer, R.R., et al. Effect of Exogenous Proline, Betaine, and Carnitine on Growth of Listeria monocytogenes in a Minimal Medium. Applied and Environmental Microbiology. 4:1359-1363. Abril 1994.
- 11.31. El Marrakchi, A., Hamama, A. Ocurrence of Listeria monocytogenes in Milk and Dairy Products Produced or Imported into Morocco. J. Food Prot., 56:256-259, Marzo 1993.
- 11.32. Mendonda, A.F. y Knabel, S.J. Anovel Strictly Anaerobic Recovery and Enrichment System Incorporating Lithium for Detection of Heat-Injured Listeria monocytogenes in Pasteurized Milk Containing Background Microflora. Applied and Environmental Microbiology. 11:4001-40 08. Nov. 1994.
- 11.33. Carlin, F., Nguyenthe, C. Fate of Listeria monocytogenes on four types of processed green salads. Lett. Appl. Microbiol., 18:222-226, Abril 1, 994.
- 11.34. Buchanan, R.L. Microbiological Criteria for Cooked, Ready-to-Eat Shrimp and Crabmeat. Food Technol., 157-160, Abril 1, 991.
- 11.35. Forbes, S.T. Manual de Métodos para el Estudio y la Evaluación de los Recursos Pesqueros. Roma. FAO. 1974. 144p.
- 11.36. Bailey, J.S. and Cox, N.A. Universal Preenrichment Broth for the Simultaneous Detection of Salmonella and Listeria in Foods. J. Food Prot., 55: 256-259, Abril 1, 992.
- 11.37. Slanetz, L.W., et al. Microbiological Quality of Foods. Proceeding of Conference Held at Franconia. New York. 1963. 274 p.
- 11.38. Forbes, S.T. Manual de Métodos para el Estudio y la Evaluación de los Recursos Pesqueros. Roma. FAO. 1974. 144p.
- 11.39. Kampelmacher E.H. and Mossel, D.A. Listeria monocytogenes: attributes and prevention of transmission by food. Culture. OXOID. 10:1-3. March 1989.

- 11.40. Gini, G.A. Manual de Procedimientos para la Identificación de las Bacterias con Importancia Clínica. Guatemala. 1994. 123p. (p.29-37).
- 11.41. Lawrence, L. y Gilmour, A. Incidence of Listeria spp. and Listeria monocytogenes in Poultry Processing Environment and in Poultry Products and Their Rapid Confirmation by Multiplex PCR. Applied and Environmental Microbiology. 12:4600-4604. Dic. 1994.
- 11.42. Castillo, Norma Elizabeth. Determinación del tiempo necesario para eliminar Vibrio cholerae 01 biotipo el Tor por la técnica de blanqueado del camarón Penaeus spp. previamente contaminado. Guatemala: USAC. (tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1195. 51p.
- 11.43. Gaitán, L.B. Pruebas de Mortalidad en Camarones del Género Penaeus Producidas por Melaza. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis de Graduación, Facultas de C.C.Q.Q. y Farmacia. 1992.
- 11.44. Pretto, R. Manual de Cría de Camarones Peneidos en Estanques de Aguas Salobres. Panamá: Dirección General de Acuicultura. 1984.
- 11.45. López, I.C. Influencia de la Temperatura y la Salinidad en la Distribución y Abundancia de Post-larvas de Penaeus spp. en el canal de Chiquimulilla, Iztapa, Escuintla. Guatemala. USAC. Tesis de Graduación, Facultad de C.C.Q.Q. y Farmacia. 1986 40p.
- 11.46. Barnes, R.D. Zoología de los Invertebrados. 3a., México. Interamericana. 1,985. 1157p.
- 11.47. Sharpe, M.E., Food Microbiology. 2a. Mc Graw-Hill. c 1,958. United Stated. 537p. (p.283-284).
- 11.48. Organización de Naciones Unidad para la Agricultura y la Alimentación. Manual para el Control de Calidad de los Alimentos, Análisis Microbiológico. FAO, Roma, Doc. Tec., 1,981. 65p.
- 11.49. Speck, L.M. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Food. 2a, Washington. 1984 American Public. 914p.
- 11.50. Salanetz, L.W., et al. Microbiological Quality of Foods. Proceeding of Conference held at Franconia. New York. 1963. 274p.
- 11.51. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Manual para el Control de Calidad de los Alimentos, Análisis Microbiológico. FAO. Roma, Doc. Tec., 1981. 65p.

10. ANEXOS

ANEXO 1

RESULTADOS DE LA MUESTRA ANALIZADAS DE CAMARONES

No. mx.	UVM + FB	A. MOX	A. HL	RESULTADO
1	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
2	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
3	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
4	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
5	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
6	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
7	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
8	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
9	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
10	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
11	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
12	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
13	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
14	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
15	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
16	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
17	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
18	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
19	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
20	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
21	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
22	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
23	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
24	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
25	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
26	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
27	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
28	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
29	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
30	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
31	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
32	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
33	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
34	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
35	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
36	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
37	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
38	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
39	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
40	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
41	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
42	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
43	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
44	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
45	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
46	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
47	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
48	+/+	-	+	Cepa sospechosa

CONTINUACION ANEXO 1

No. mx.	UVM + FB	A. MOX	A. HL	RESULTADO
49	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
50	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
51	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
52	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
53	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
54	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
55	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
56	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
57	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
58	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
59	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
60	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
61	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
62	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
63	+/+	-	+	Cepa sospechosa
64	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
65	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
66	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
67	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
68	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
69	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
70	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
71	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
72	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
73	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
74	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
75	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
76	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
77	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
78	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
79	+/+	+	+	Cepa sospechosa
80	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
81	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
82	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
83	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
84	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
85	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
86	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
87	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
88	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
89	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
90	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
91	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
92	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
93	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
94	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
95	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
96	+/+	-	-	Negativo para L. Monocytogenes
97	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
98	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
99	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes
100	+/+	+	-	Negativo para L. Monocytogenes

ANEXO 2

Medios y otras Soluciones que fueron utilizadas durante el ensayo:

- Medio de Universidad de Vermont (UVM):

Proteosa Peptona	5 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	20 g
KH ₂ PO ₂	1.35 g
Na ₂ HPO ₄	12 g
Esculina	1 g
Acido nalidixico (2% en NaOH 0.1M)	1 ml
Acriflavina	12 mg
Agua destilada	1 L
- CALDO FRASER:

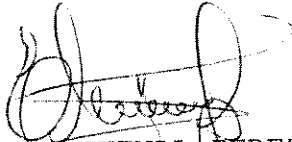
Proteosa peptona	5 g
Triptona	5 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	5 g
KH ₂ PO ₄	20 g
Na ₂ HPO ₄	1.35 g
Esculina	12 g
Acido nalidixico (2% en NaOH 0.1M)	1 g
Cloruro de litio	3 g
Agua destilada	1 L
- MEDIO OXFORD MODIFICADO (MOX)

Mox agar base:	
Columbia Blood Agar Base	39-44 g/l
Agar	2 g/l
Esculina	1 g/l
Citrato férrico de amonio	0.5 g/l
Cloruro de litio	15 g/l
Solución de colistina 1%	1 ml
Agua destilada	1 L

- Solución de Colistina:
 - Colistin, Methane sulfonate (Sigma C1511) 1g
 - 0.1 M Buffer de Fosfato, pH 6.0 1000 ml
- Solución de Moxalactam:
 - Sodio (o amonio) Moxolactámico (Sigma) 1 g
 - 0.1 M Buffer de Fosfato, pH 6.0 100 ml
- AGAR SANGRE DE CABALLO (HL)
 - Columbia Blood Agar Base 1000 ml
- AGAR PARA PRUEBA DE CAMP
 - Usar Trypticase Soya conteniendo 5 % de sangre de cordero.
- CALDO PARA FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS
 - Base:
 - Peptona 10 g
 - Lab Lemco Powder (OXOID) 1 g
 - Cloruro de sodio 5 g
 - Agua destilada 900 ml
 - Rojo fenol 1 ml

A cada 100 ml de medio esterilizado agregar los siguientes azucares previamente esterilizados por filtración:

Xilosa	5 %
Manitol	10 %
Ramnosa	5 %




AMPARO CHENAL PEREZ
INVESTIGADOR



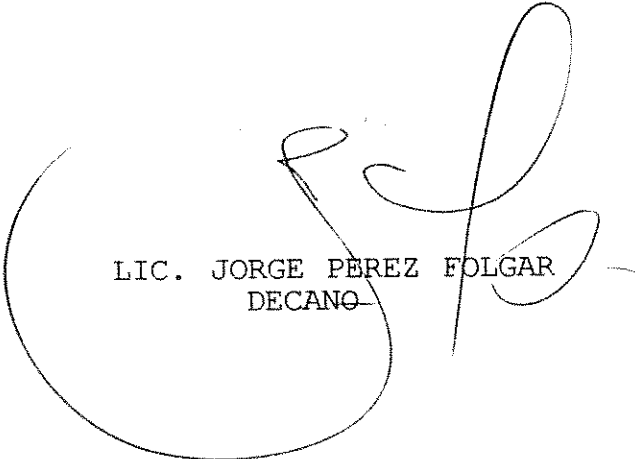
LICDA. MARIA ROSARIO SANDOVAL
ASESORA



LICDA DINORA CASTRO MONTESINOS
CO-ASESORA



LIC. GERARDO ARROYO CATALAN
DIRECTOR



LIC. JORGE PEREZ FOLGAR
DECANO