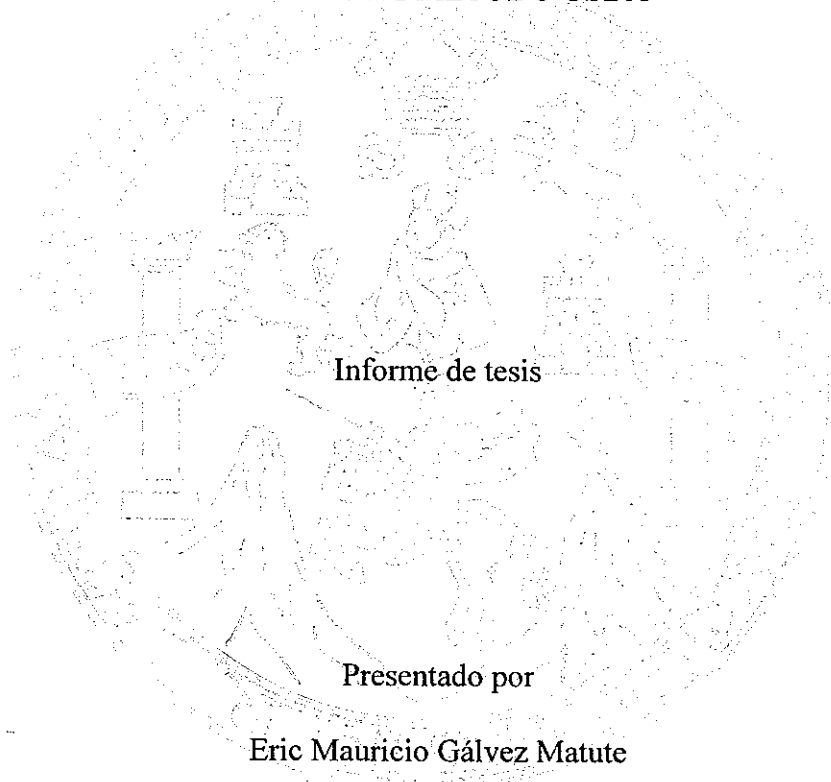


UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

DETERMINACION DE LA CONTAMINACION POR *LISTERIA MONOCYTOGENES*  
EN QUESOS DE PRODUCCION COMERCIAL EN GUATEMALA  
USANDO EL METODO USDA



Informe de tesis

Presentado por

Eric Mauricio Gálvez Matute

Para optar al título de

Químico Biólogo

Guatemala, julio de 1997



06  
T(1830)  
C.4

**JUNTA DIRECTIVA DE LA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

<b>DECANO</b>	LIC. JORGE RODOLFO PEREZ FOLGAR
<b>SECRETARIO</b>	LIC. OSCAR FEDERICO NAVE HERRERA
<b>VOCAL I</b>	LIC. MIGUEL ANGEL HERRERA GALVEZ
<b>VOCAL II</b>	LIC. GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
<b>VOCAL III</b>	LIC. RODRIGO HERRERA SAN JOSE
<b>VOCAL IV</b>	BR. ANA MARIA RODAS CARDONA
<b>VOCAL V</b>	BR. HAYRO OSWALDO GARCIA GARCIA

## ACTO QUE DEDICO

A Dios Todo Poderoso

A la Santísima Virgen María

A mis Padres:           Héctor Guillermo Gálvez Gámez  
                                  Ana María Matute de Gálvez

A mis Abuelos:       José G. Gálvez (Q.E.P.D.)  
                              María Gámez de Gálvez (Q.E.P.D.)  
                              Felix Matute  
                              Milagro Peña de Matute

A mis Hermanos:      Alvaro, Brenda y Salim

A mi Sobrino:         Alvaro Eduardo

A Claudia Palma

A mi Familia

**\_ DEDICO ESTA TESIS**

A la Universidad de San Carlos de Guatemala

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

A mis catedráticos y compañeros

Al Instituto Centroamericano de Investigaciones y Tecnología Industrial

A mi asesora Licda. Sheryl de Cabrera

A Licda. Dinora Castro

## INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. ANTECEDENTES	3
4. JUSTIFICACIONES	15
5. OBJETIVOS	16
6. HIPOTESIS	17
7. MATERIALES Y METODOS	18
8. RESULTADOS	24
9. DISCUSION DE RESULTADOS	28
10. CONCLUSIONES	31
11. RECOMENDACIONES	32
12. REFERENCIAS	33
13. ANEXOS	40

## 1. RESUMEN

Desde que se dio el primer brote de listeriosis en 1985, se comenzó a buscar información destinada a satisfacer la necesidad de conocer más acerca de esta enfermedad. Debido a que en Guatemala no se conocían datos que reflejaran una posible, contaminación, se decidió efectuar el siguiente estudio para conocer la prevalencia y determinar la magnitud del problema. Bajo la hipótesis de que en Guatemala existe contaminación de quesos por *Listeria monocytogenes*, se utilizaron noventa y un lotes de quesos, todos pertenecientes a un proyecto de investigación ICAITI-COGUANOR, procedentes de fábricas en Guatemala, utilizando un tipo de muestreo "Por conveniencia". Utilizando el método propuesto por la USDA se procesaron las muestras encontrándose que de las muestras analizadas, cinco se identificaron como *Listeria monocytogenes* positivo, permitiendo comprobar la hipótesis. Efectuando el Análisis Estadístico por medio de Estadística Descriptiva, expresando el resultado en porcentaje se obtuvo un 5.49%. Como una prueba adicional, ya que no se encuentra dentro de la metodología original, se decidió llevar a cabo la identificación serológica de las cinco cepas aisladas, comprobándose que efectivamente corresponden a la especie en estudio. Con el resultado anterior, se puede concluir que los quesos pueden convertirse en agentes portadores de contaminación, pudiendo en algún momento provocar listeriosis, dependiendo también de la virulencia de la cepa y de la resistencia de la persona a desarrollar esta enfermedad.

## 2. INTRODUCCION

Listeria monocytogenes se ha transformado, de un microorganismo relativamente desconocido, a un patógeno plenamente reconocido estrechamente relacionado con alimentos. Antes de un brote de listeriosis ocurrido en 1985 asociado a los quesos, poco se sabía acerca de este microorganismo. Este y otros brotes, han conducido a investigaciones tendientes a obtener una serie de conocimientos poniendo en relieve la necesidad de resolver muchas preguntas críticas, particularmente en relación con el procesamiento de alimentos, evaluación de la sobrevivencia del patógeno sometido a tratamientos con calor usados en la industria alimenticia, información con respecto a la relación con la salud humana y el desarrollo de metodologías analíticas para la identificación.

En Guatemala no se conocen datos que reflejen la contaminación por Listeria monocytogenes. Partiendo de la hipótesis que en Guatemala existe contaminación de quesos por este microorganismo, el presente estudio tuvo como objetivo identificar a los quesos como agentes de contaminación y dar a conocer la importancia de evaluar la prevalencia de Listeria monocytogenes en quesos listos para la venta. El procedimiento para llevar a cabo el estudio fue el propuesto por la USDA utilizando instalaciones, equipo y reactivos del Instituto Centro Americano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI). El diseño estadístico consistió en llevar a cabo un tipo de muestreo "por conveniencia" y los resultados obtenidos se interpretaron por Estadística Descriptiva (expresados en porcentaje).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 GENERO LISTERIA:

##### 3.1.1. TAXONOMIA:

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.

Recientes estudios sobre el rRNA e hibridaciones DNA-DNA, han dado como resultado, la división del género en siete especies, con dos grupos genómicamente distintos. En un grupo se encuentran las especies Listeria murravi y Listeria gravi, que son raramente aisladas y son consideradas no patógenas. Las otras cinco especies incluyen tres hemolíticas (Listeria monocytogenes, Listeria seeligeri y Listeria ivanovii) y dos especies no hemolíticas (Listeria innocua y Listeria welshimeri). Listeria denitrificans ha sido transferida al género Jonesia. De todas estas sólo Listeria monocytogenes y raramente Listeria ivanovii son patógenos humanos. Listeria ivanovii es más patógeno para animales. Debido a su potencial patogénico, L. monocytogenes debe ser diferenciada de las otras especies (1 - 3).

##### 3.1.2. PROPIEDADES BIOLÓGICAS:

Las características del género consisten en bacilos pleomórficos, Gram positivo, no esporulados, anaeróbios facultativos, móviles (por flagelos peritricos); siendo esta



movilidad con características de revuelta de las células sobre sí mismas, catalasa positivo, hidrolizan la esculina, oxidasa negativo, fermentan la glucosa sin producción de gas, Voges-Proskauer positivo, no producen indol o ácido sulfhídrico y no hidrolizan la urea (4, 5).

### 3.2. LISTERIA MONOCYTOGENES:

#### 3.2.1. HABITAT:

Es una especie ampliamente distribuida en la naturaleza, aislada de insectos, agua, forraje, suelo, heces de pájaros, rumiantes y del hombre. Recientemente se ha aislado de alimentos procesados crudos, incluyendo productos lácteos, carne, vegetales y mariscos (1).

#### 3.2.2. CONDICIONES AMBIENTALES DE CRECIMIENTO:

3.2.2.1. Temperatura: 3 a 45 C; teniendo un rango óptimo de 30 a 37 C.

3.2.2.2. pH: rango de 5.6 a 9.6, con un pH óptimo de 7.0; en medios microbiológicos puede crecer a un pH mayor o igual a 4.4, siendo un factor importante la temperatura de incubación. Tradicionalmente ha sido considerada relativamente sensible al ambiente ácido y no apta para crecer a pH menor o igual a 5.5.

3.2.2.3. Concentración de Dióxido de Carbono y Oxígeno: el crecimiento es incrementado bajo condiciones microaerofilicas.

3.2.2.4. Concentración de Cloruro de Sodio: es capaz de crecer en concentraciones de hasta 10 por ciento (6 - 9).

### 3.2.3. IDENTIFICACION:

Las características principales usadas para diferenciar a Listeria monocytogenes de las demás especies del género Listeria spp, incluyen los análisis listados en los Anexos 1 y 2.

### 3.2.4. PATOGENICIDAD:

La infección producida por L. monocytogenes es denominada Listeriosis y es considerada una zoonosis. Bajo condiciones óptimas, cualquiera puede ser infectado pero muchas personas pueden no desarrollar la enfermedad, debido a que su Sistema Inmune está en capacidad de eliminar el microorganismo. La subpoblación que está a riesgo de desarrollarla son embarazadas, recién nacidos, infantes y adultos inmunocomprometidos o con terapia inmunosupresora. La listeriosis no se desarrolla igual en todas las personas, lo que indica que algunas de ellas poseen cierta resistencia a desarrollar la enfermedad (12 - 14).

En el hombre se distinguen varias formas de listeriosis:

3.2.4.1. Forma Anginosa: caracterizada por el engrosamiento de los ganglios linfáticos cervicales y monocitosis hemática, fácil de confundir con la Mononucleosis Infecciosa causada por el virus Epstein-Barr.

3.2.4.2. Forma Oculo-glandular: conjuntivitis purulenta, a veces con engrosamiento de la parótida y de los maxilares.

3.2.4.3. Forma Cervico-glandular: infección de los ganglios linfáticos cervicales y maxilares con posibilidad de fistulación y emisión de material purulento al exterior.

3.2.4.4. Infección del Sistema Nervioso Central: con varias manifestaciones clínicas como meningitis purulenta, encefalitis, meningoencefalitis y raramente absesos cerebrales.

3.2.4.5. Forma Séptica: con localización sucesiva de abscesos en varios órganos principalmente hígado y bazo.

3.2.4.6. Granulomatosis Séptica del neonato: es la más peligrosa y difundida forma de listeriosis, caracterizada por granulomatosis miliar sobre el hígado, bazo y glándulas linfáticas.

3.2.4.7. Infección durante el embarazo: transmisión intrauterina, transplacentaria o intravaginal al feto o neonato.

3.2.4.8. Forma Cutánea: manifestación de la diseminación séptica de la infección (1, 2).

Aunque la dosis infectiva de L. monocytogenes necesaria para producir infección permanece desconocida, se encontró que en los quesos que fueron ingeridos por personas que desarrollaron listeriosis, había una concentración de 100 a 1000 UFC/gr. Según información proporcionada por Ryser y Marth (15), la U.S. Food and Drug Administration adoptó la tolerancia de 0 UFC/gr en quesos y otros alimentos.

Las infecciones por Salmonella spp. y otras bacterias enteropatógenas pueden favorecer el paso transintestinal de L. monocytogenes de modo que si en el alimento implicado está presente una bacteria enteropatógena además de L. monocytogenes se puede favorecer el desarrollo de listeriosis (16).

(1983), se dio otro brote en el que el alimento implicado fue la leche y murieron catorce personas. Luego, en 1985, en Los Angeles, California, se dan cuarenta muertes y el alimento implicado fue el queso tipo mexicano. Finalmente, en 1987 en Suiza, se dan treinta y una muertes siendo el alimento implicado los quesos (21 - 25).

El origen exacto de la contaminación es usualmente difícil de establecer retrospectivamente. La infiltración del microorganismo al alimento con su subsecuente sobrevivencia durante el procesamiento y almacenamiento es frecuentemente el inicio de la contaminación (26).

Estudios sobre la prevalencia de L. monocytogenes en quesos se han reportado de muchos países incluyendo Estados Unidos, Reino Unido, Alemania, Italia, Holanda y Suiza. Los países encontrada ha sido de 0.55 a 14.5 por ciento y los niveles de mortalidad son de 28 a 33 por ciento (27, 28).

Se ha encontrado que L. 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 (1, 2, 24).

La habilidad de este patógeno de multiplicarse a bajas temperaturas lo hace particularmente importante en relación la seguridad de alimentos refrigerados (22, 27).

Los estudios realizados indican que la composición de los quesos, las condiciones de almacenamiento, pH, concentración de sal y la concentración del inóculo influye en el crecimiento del microorganismo.

Así, se ha encontrado que los quesos que resisten más fácilmente el crecimiento de L. monocytogenes son, entre otros: ricotta, fresco, panela ranchero, etc. Los quesos que

difícilmente soportan el crecimiento incluyen los quesos crema, azul, suizo, Cheddar, duro, Monterrey y Colby.

Además, el crecimiento es proporcional a la humedad e inversamente proporcional con la concentración de sal (28 - 30).

Sin embargo, existen evidencias que indican que L. monocytogenes tiene capacidad de sobrevivir en superficies secas (26).

Se han realizado estudios con leche ultrafiltrada y lógicamente constituye en mejor medio de crecimiento a causa de que la concentración de proteínas, grasas y fosfatos aumenta, teniendo un impacto significativo en el crecimiento de bacterias (31, 32).

### 3.2.7. ORIGEN DE LA CONTAMINACION:

#### 3.2.7.1. Pasteurización:

Este proceso consiste en el calentamiento rápido de la leche hasta alcanzar los 63 C, mantener esta temperatura durante 30 minutos y luego enfriarla rápidamente. Además de reducir la población de patógenos, este tratamiento también inactiva la enzima lipasa que, de otra manera, enranciaría la leche. Una variante de este proceso es la pasteurización a alta temperatura por corto tiempo, que emplea una temperatura por lo menos de 72 C por un mínimo de 15 segundos. Este es uno de los puntos que han creado más controversia entre investigadores ya que muchos aseguran que este proceso reduce la población microbiana a niveles tales que no representa peligro para la salud humana (29, 33, 34).

La FDA indica que la leche pasteurizada es uno de los alimentos más seguros (33). Sin embargo, estudios realizados por Doyle y Fleming indican que L. monocytogenes es

capaz de sobrevivir al tratamiento por calor. Ellos sugieren que esta resistencia es debida a la localización intracelular de bacterias en los polimorfonucleares bovinos (5, 29, 35).

Además, se ha encontrado que cuando las bacterias son expuestas previamente a un shock térmico subletal, se provoca un marcado y estable incremento en la resistencia a la temperatura de pasteurización (35, 36).

Por todo esto, se ha considerado a la leche y sus derivados como posibles fuentes de contaminación, desde el punto de vista que el ganado ocasionalmente excreta L. monocytogenes en la leche aún tres meses después de que han desaparecido los síntomas de mastitis (23, 27, 29, 34).

#### 3.2.7.2. Resistencia a bajas temperaturas:

La preservación de los alimentos por congelamiento está basada en el uso de temperaturas bajas suficientes para detener el metabolismo y reducir las reacciones bioquímicas producidas por microorganismos y así extender la vida media del producto (37, 38).

Muchos estudios sobre L. monocytogenes en productos lácteos se han enfocado a productos almacenados a temperatura de refrigeración (4 a 10 C). Los helados y otros productos lácteos congelados han recibido poca atención; sin embargo, debido a la habilidad de L. monocytogenes de crecer a bajas temperaturas, un inóculo inicial pequeño puede resultar en una contaminación sustancial. Por tal motivo, la FDA y la USDA, toman a los productos lácteos congelados como productos a riesgo de contaminación (7, 34).

### 3.2.7.3. Contaminación Post-Pasteurización:

Esta contaminación constituye la más importante de todas, ya que son muchos los factores o condiciones que influyen en ella. Para comenzar, está la adición a los quesos y otros productos lácteos de colorantes, sabores artificiales y otros ingredientes que pudieran estar contaminados y que llevan la contaminación al producto final (34). Se ha demostrado que las manos de los manipuladores de alimentos, pueden estar contaminados con coliformes, E. coli, S. aureus, Salmonella spp y por lo tanto es muy probable que las manos de estos operarios tengan un papel importante en la contaminación por L. monocytogenes (27).

Otro factor muy importante que contribuye a la contaminación post-pasteurización es la resistencia que puede crear L. monocytogenes a los agentes antimicrobianos, tales como hipocloritos, nitritos, etc. Se ha comprobado que si en las superficies quedan bacterias viables después de una limpieza ineficaz, dichas bacterias se adhieren a la superficie y forman microcolonias las cuales son muy resistentes al hipoclorito hasta 100 ppm. Sin embargo lo anterior no ocurre si la limpieza se efectúa con intervalos de 24 horas o menos, ya que no se permite la formación de microcolonias (39). Caso similar ocurre con los agentes químicos aniónicos y catiónicos. Esto es producido porque las células de la microcolonia adherida forman una capa que previene la penetración del químico. Además, por ser una bacteria Gram positivo posee el ácido lipoteicoico extracelular el cual, siendo lipofílico, previene la penetración de sanitizantes. Por otra parte, produce una sustancia parecida a un lipopolisacárido que podría incrementar la envoltura lipofílica (40).

Todo lo anterior apunta a que, una vez L. monocytogenes ha contaminado una planta de procesamiento de alimentos puede persistir por largos periodos de tiempo (18)

### 3.2.8. METODOS DE ANALISIS:

Dos métodos se encuentran disponibles para el análisis e identificación de L. monocytogenes en alimentos. Estos métodos son los propuestos por la FDA y la USDA respectivamente, los cuales poseen diferencias que radican en la composición de los medios microbiológicos utilizados.

Básicamente, los dos métodos constan de tres pasos principales: enriquecimiento, aislamiento e identificación (29, 41, 42).

El paso de enriquecimiento consiste en utilizar medios microbiológicos que restablezcan las bacterias dañadas por tratamientos inefectivos con calor, frío o agentes sanitizantes y así, aumentar su población. Este paso es de gran importancia, ya que, por lo general la población del microorganismo es muy baja y no se puede detectar por técnicas de plaqueo directo. Estos medios contienen sustancias como la acriflavina y el ácido nalidíxico que inhiben microorganismos Gram positivo y Gram negativo, respectivamente. Al respecto, el método USDA utiliza un primer medio de enriquecimiento UVM (University of Vermont Medium), que tiene mayor poder de amortiguador de pH que el que posee el propuesto por FDA, el EB (Enrichment Broth), siendo un factor importante desde el punto de vista que L. monocytogenes es susceptible a los ambientes con pH debajo de 4.4 (11, 42 - 45). —



El segundo medio de enriquecimiento (Fraser Modificado) se utiliza en los dos métodos, que además de restablecer bacterias, actúa como una prueba de tamizaje debido a que posee iones férricos que unidos al producto de la hidrólisis de la esculina producen un oscurecimiento y/o emnegrecimiento del medio. Sin embargo, debe tenerse cuidado ya que puede producir un alto porcentaje de falsos positivos (aproximadamente 57 por ciento) con especies como Enterobacter aerogenes, Klebsiella pneumoniae, Lactobacillus acidophilus, Pseudomonas aeruginosa, algunas cepas de Staphylococcus aureus, algunas cepas de Streptococcus spp. y levaduras, entre otros (41).

En el segundo paso (Aislamiento), se utilizan medios selectivos para poder aislar las colonias de Listeria spp. La selectividad se la proporcionan sustancias como el Moxalactam y la colistina, que ayudan a la inhibición del crecimiento de microorganismos no deseados. Los medios más comúnmente utilizados son MOX, OxA LPM y Mc Bride, encontrándose que los que dan menos porcentaje de falsos negativos son LPM, OxA y Mox. Sin embargo, se ha sugerido que se efectúe un plaqueo múltiple con OxA y por lo menos uno de los otros medios (42).

Existe una ventaja del OxA y MOX sobre el LPM y es que este último necesita la observación de las colonias sospechosas con luz fluorescente, mientras que los otros dos medios no lo necesitan ya que las colonias son negras con halo negro (43).

Finalmente, el tercer paso consiste en una serie de pruebas de tamizaje y luego confirmatorias, las cuales se aplican de igual forma en los dos métodos (Ver Anexos 1 y 2).

Estas pruebas conllevan a la identificación a nivel de especie de la cepa en estudio (diferencian entre sí a las especies de Listeria spp. y también diferencian al género de otros con características similares (11).

Por lo general, el método USDA es aplicado a carnes y productos de aves de corral, pero por todo lo anterior, el método se recomienda como el mejor, para todo tipo de alimento y ambiente (42, 43).

#### 4. JUSTIFICACIONES

El presente trabajo de investigación, se basa fundamentalmente en que se ha observado en otros países que Listeria monocytogenes es una bacteria de carácter oportunista generalmente, que ataca bajo circunstancias muy especiales del hospedero, creando cierta patología que puede ir desde inofensiva, hasta ser maligna o mortal.

Se sabe que este microorganismo es transmitido principalmente por contaminación alimenticia, en especial por productos lácteos, por lo que es necesario que se estime su incidencia en Guatemala para determinar la magnitud del problema y así proporcionar información que ayude a reducir una posible contaminación y como consecuencia una epidemia. No se han llevado a cabo estudios que reflejen la importancia de incluir el análisis dentro de la rutina microbiológica. Este estudio pretende hacerlo, comenzando por quesos nacionales, dando la pauta para que se lleven a cabo estudios similares en otros alimentos con riesgo de tener esta contaminación.

## 5. OBJETIVOS

Los objetivos que se persiguen alcanzar con la realización del presente estudio son:

- 1) Reconocer a los quesos como agentes portadores de contaminación por Listeria monocytogenes.
- 2) Dar a conocer la importancia de evaluar la prevalencia de Listeria monocytogenes en quesos listos para la venta en Guatemala.

## 6. HIPOTESIS

En Guatemala existe contaminación de quesos por

Listeria monocytogenes

## 7. MATERIALES Y METODOS

### 7.1. UNIVERSO DE TRABAJO:

El universo de trabajo consistió en 91 muestras de quesos obtenidos por un muestreo "por conveniencia", perteneciente a un proyecto de investigación ICAITI-COGUANOR, cada uno con varias submuestras, todas procedentes de fábricas en Guatemala.

### 7.2. MEDIOS:

#### 7.2.1. RECURSOS HUMANOS:

- Br. Eric Mauricio Gálvez Matute (tesista).
- Licda. Sheryl S. de Cabrera (asesora).
- Licda. Dinora Castro (supervisora).

#### 7.2.2. RECURSOS ECONOMICOS E INSTITUCIONALES:

- Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI).

### 7.3. MATERIALES:

#### 7.3.1. Cristalería:

Erlenmeyer (50, 250 y 1000 ml)

Fleakers de 500 ml

Tubos de ensayo (varios tamaños)

Pipetas (0.1, 1, 5 y 10 ml)

Cajas de Petri

Probetas (100 y 1000 ml)

Recipientes termorresistentes para esterilizar

7.3.2. Equipo:

Balanza semianalítica marca Precision, 1200 g. max.

Espátula

Estufa marca Thermolyne type 1000 stir plate

Magneto

Autoclave marca Castle

Gradillas

Mechero tipo Bunsen

Incubadora de 35 C marca Precision

Incubadora de 29 C marca PsycroTherm

Microscopio marca Galen III

Hisopos estériles

Asas Bacteriológicas

Campana de flujo laminar marca Laminaire

Bomba de vacío

Kitasato de 1000 ml

Filtros de membrana

Marcador indeleble

Papel indicador de esterilización

Baño de María para licuar medios

Baño de María a 48 C marca Thelco

### 7.3.3. Medios Microbiológicos:

Caldo University of Vermont Medium (UVM)

Caldo Fraser

Modified Oxford (MOX) Agar

Agar Sangre de Caballo

Caldo Brain Heart Infusion (BHI)

Agar BHI

Base O/F

Caldo Nitrado

Caldo base para carbohidratos

Caldo MR-VP

Agar Sangre de Carnero

Bacto Motility Agar - DIFCO

### 7.3.4. Reactivos:

Ramnosa 5%

Xilosa 5%

Manitol 10%

Glucosa 5%

Alfa-Naftol



KOH 40%

Rojo de Metilo en etanol 95%

Alfa Naftilamida en Acido Acético 5N

Acido Acético 5N

Buffer de Fosfato de Potasio

Reactivos para tinción Gram

7.3.5. Pruebas específicas:

Prueba de oxidasa (DIFCO)

Prueba serológica para Listeria monocytogenes (DIFCO)

7.4. PROCEDIMIENTO:

7.4.1. Limpiar muy bien la superficie de cada paquete de queso con el desinfectante en uso (cloruro de mercurio).

7.4.2. Obtener cantidades iguales de cada subunidad hasta hacer 25 gramos.

7.4.3. Agregar en 225 ml de caldo de enriquecimiento (UVM), los 25 gramos de muestra. Pasar el material a una bolsa y desintegrarlo manualmente por dos minutos. Transferir el material a un frasco estéril (fleaker) e incubar por 20 -24 horas a 29 C.

7.4.4. Transferir 0.1 ml del caldo incubado a 10 ml de caldo de enriquecimiento Fraser. Incubar a 35 C por 24 horas. Comparar el color de cada tubo con un tubo no inoculado. El ennegrecimiento es el resultado de la hidrólisis de la esculina. Los tubos que no presentan esta característica son reportados como negativo para Listeria spp.

7.4.5. A cada tubo de caldo Fraser con resultado positivo, introducirle un hisopo estéril y descargarlo en una caja conteniendo MOX Agar; con un asa bacteriológica esparcir el material con el fin de obtener colonias separadas.

7.4.6. El MOX Agar es altamente selectivo y proporciona colonias de Listeria spp. típicas en tamaño, color y forma. La esculina es hidrolizada, resultando zonas negras alrededor de la colonia (translúcida, redonda y pequeña). Las colonias son visibles después de 24 horas de incubación, pero si no hay crecimiento, la incubación debe continuar otras 24 horas para detectar cepas de crecimiento lento.

7.4.7. Aislar cinco colonias sospechosas y esparcirlas en una caja conteniendo Agar Sangre de Caballo. Debido a que la capa de agar es muy delgada, es fácil de rasgar y debe estriarse cuidadosamente. Incubar a 35 C por 24 horas. Además, introducir el asa en un tubo con medio Bacto Motility (DIFCO), para observar la movilidad tipo sombrilla.

7.4.8. Examinar las cajas de agar sangre de caballo y seleccionar colonias translúcidas que presentan zona de beta hemólisis.

7.4.9. Las colonias sospechosas deben picarse y transferirlas a caldo BHI. Incubar a 20-25 C por 24 horas. Después, hacer la prueba de movilidad en gota pendiente y también la tinción de Gram.

7.4.10. Proceder con la prueba de identificación sólo si el cultivo es hemolítico, Gram positivo, tiene movilidad en acrobacia en gota pendiente, movilidad en sombrilla positivo y aparece como cultivo puro.

7.4.11. A partir del caldo BHI sembrar un slant de agar BHI que servirá para las pruebas de catalasa y oxidasa. Inocular también agar bilis esculina, MR-VP, caldo nitrado, medio O/F y caldo de fermentación de ramosa, xilosa y manitol.

7.4.12. Efectuar la prueba de CAMP de la manera siguiente: inocular una línea de cultivo fresco de S. aureus y otro de Rhodococcus equi en una placa de agar sangre de carnero. Estriar la cepa sospechosa de ser L. monocytogenes a un ángulo de 90 de las cepas anteriores. Incubar la placa de agar a 35 C por 24-48 horas (11).

7.4.13. Además se tomará la iniciativa de agregar una prueba serológica para la identificación de

## 8. RESULTADOS

En el presente estudio se realizó una evaluación de la presencia de Listeria monocytogenes en 91 lotes de varios tipos de quesos no madurados que pertenecían a un proyecto ICAITI-COGUANOR, tomando como base el método propuesto por la USDA (United States Department of Agriculture).

Al efectuar la parte experimental del estudio, se obtuvo los siguientes resultados:

Las muestras que dieron resultado positivo en caldo Fraser, esto es, el oscurecimiento del medio a causa de la reacción del producto de la hidrólisis de la esculina con los iones férricos presentes, fueron 49. Estas se detectaron después de 24 horas de incubación. Las muestras que no dieron reacción positiva durante el período de incubación inicial, se incubaron 24 horas más, sin producirse ningún cambio en los resultados. Luego de obtener las muestras con resultado positivo en caldo Fraser, se procedió al paso de aislamiento en el que se obtuvo resultado positivo en 24 muestras de las 49 registradas como positivas anteriormente.

Posteriormente, por medio de las pruebas descritas en el Anexo 1, se encontró que de las 24 cepas aisladas, únicamente 8 correspondían al género Listeria, por lo que se procedió a la identificación bioquímica descrita en el Anexo 2 con las cepas anteriores, obteniéndose como resultado que 5 presentaron las características de L. monocytogenes, permitiendo comprobar la hipótesis de que existe contaminación de este tipo en Guatemala, siendo los resultados parecidos con los obtenidos por investigaciones realizadas en otros países bajo circunstancias similares (3, 41).

Como una prueba adicional, ya que no se encuentra dentro del método original, se llevó a cabo la identificación serológica de las cinco cepas anteriores, confirmándose que correspondían a la especie en estudio.

El resultado final, corresponde a 5.49 %. A medida que el análisis se realiza, se observa que se van descartando una considerable cantidad de falsos positivos. Por tal motivo, es necesario incrementar el poder inhibitorio de los medios de cultivo, a fin de aumentar la capacidad selectiva de los mismos.

Dentro de los quesos utilizados en la investigación, que fueron quesos no madurados están los tipos crema, seco y fresco. En esta última clasificación se encontraban los subtipos capas, cottage, ricotta, cacciocavallo, fresco y requesón. Los quesos en los cuales se pudo comprobar la contaminación por L. monocytogenes corresponden al tipo fresco, específicamente los subtipos cacciocavallo, fresco, ricotta y capas. Los quesos en los que no se pudo comprobar la contaminación fueron los pertenecientes a los tipos crema y seco. Los datos en los cuales se muestra los resultados obtenidos durante cada paso de la investigación pueden ser observados en los Anexos 3 y 4.

Tabla 1  
 PORCENTAJE DE RESULTADOS POSITIVOS EN PASOS ENRIQUECIMIENTO, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION

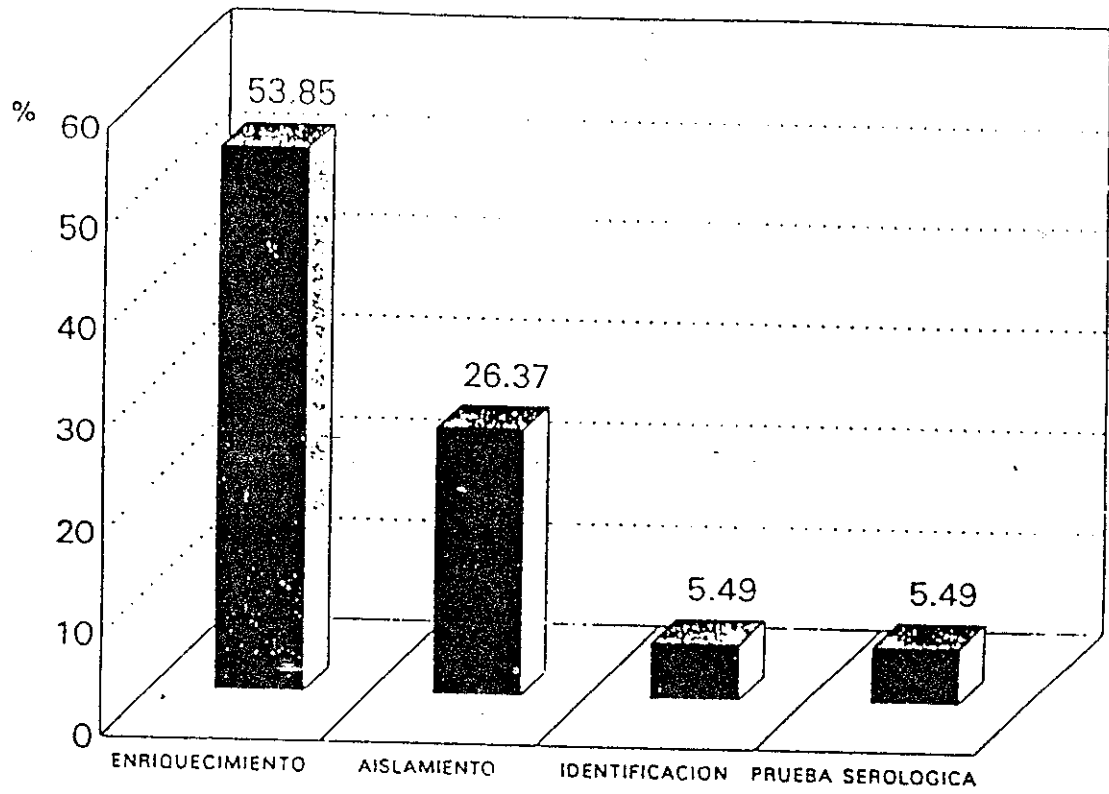
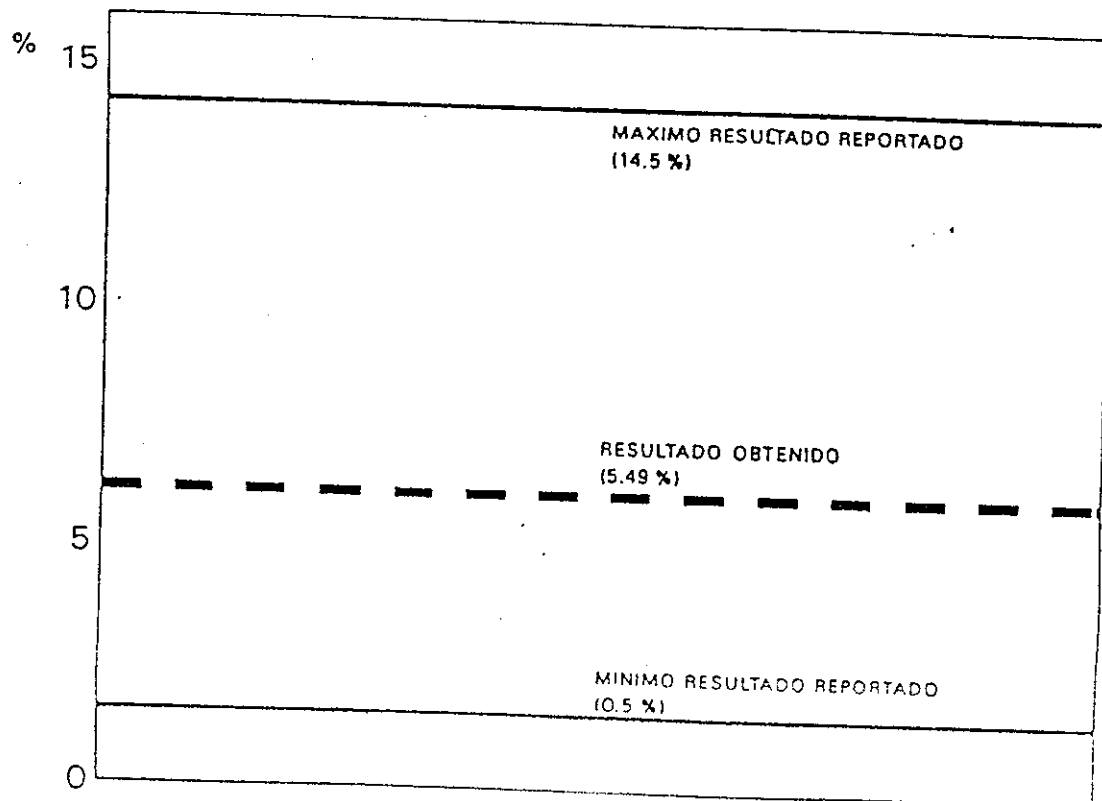


Tabla 2  
 COMPARACION DEL RESULTADO OBTENIDO CON LOS REPORTADOS



## 9. DISCUSION DE RESULTADOS

Con respecto a los resultados obtenidos, de acuerdo a la metodología, es importante señalar el hecho de que de las 49 muestras que dieron reacción positiva en la paso de enriquecimiento con el caldo Fraser, únicamente 5 fueron positivas. Lo anterior corresponde a un valor de 48.35% de falsos positivos. Sin embargo, este valor está por debajo del reportado por la bibliografía (41), que corresponde a casi 60%. Además, al comparar este valor con resultados que se obtienen de pasos de enriquecimiento de métodos para la detección de otros microorganismos, se puede comprender que es bajo. El tiempo de análisis es otro factor muy importante, ya que se puede obtener un resultado, relativamente rápido, aunque existen métodos más rápidos y con mayor capacidad para detectar la contaminación, (i. e. ensayos utilizando ADN recombinante). Con estos métodos, se puede ahorrar tiempo y así el producto puede salir más confiablemente y rápidamente al mercado.

De la misma forma, en el paso de aislamiento se obtuvo un valor de 20.89% de falsos positivos. Estudios realizados bajo similares circunstancias indican que es recomendable el aislamiento en agar MOX y OxA para disminuir los falsos positivos (41). Por otra parte, es posible aumentar la cantidad de agentes inhibidores (acriflavina y ácido nalidixico) en los medios de enriquecimiento. De esta manera, se aumentaría la selectividad y por lo tanto proporcionar mejores resultados.

Con respecto al aislamiento con Agar MOX, se redujo significativamente el número de muestras positivas, debido a que dentro de la composición de este medio se encuentran agentes inhibidores más potentes como la colistina y el Moxalactam.

Con respecto al tipo de queso en los cuales se comprobó la contaminación, se puede observar que pertenecen al mismo tipo (fresco), esto puede deberse a las características que diferencian a este tipo de los demás, esto es, pH, concentración de cloruro de sodio y concentración de agua; aunque esta última no está plenamente comprobada, además de el proceso realizado para su fabricación. Con respecto a los tipos de queso crema, es muy probable que no hubo desarrollo de la bacteria debido a su bajo pH, además de que en la elaboración se efectúan dos procesos de tratamiento térmico. En lo referente al tipo seco, su concentración de cloruro de sodio es más alta que los otros tipos y la concentración de agua es baja, aunque, como ya se indicó anteriormente la forma en que afecta este factor a la bacteria no está comprobada.

Analizando el resultado desde el punto de vista epidemiológico se podría traducir en casos esporádicos de listeriosis como hasta ahora se han dado. Sin embargo, es necesario tomar en consideración que este valor puede verse incrementado en un momento dado debido a las condiciones sanitarias del país y conducir a una epidemia. Por todo esto, se debe concientizar a los propietarios y al personal de las plantas procesadoras de leche a fin de que tomen medidas pertinentes para sacar al mercado productos de alta calidad microbiológica. De esta manera, se debe analizar el proceso de fabricación de quesos con el objeto de encontrar el punto en cual se ha dado la contaminación. Esta contaminación pudo haber sido consecuencia de factores fortuitos, por ejemplo el hecho



de que la pasteurización no fuera efectiva; que la bacteria, estando presente en la materia prima (leche) haya resistido al tratamiento con calor. Otro factor es el que exista una contaminación dentro de la planta, es decir contaminación post-pasteurización, ya sea por el equipo o por manipulación. Si es este el caso deben tomarse las medidas para eliminar la bacteria debido a la posibilidad de contaminación de otros lotes de producto. El hecho de identificar el origen de contaminación es de gran importancia, en primer lugar para evitar pérdidas económicas a causa de la eliminación del producto del mercado y en segundo lugar para evitar enfermedades a la población susceptible.

## 10. CONCLUSIONES

- 10.1 En Guatemala existe contaminación de quesos por Listeria monocytogenes pudiendo en cierto momento conducir a una epidemia de listeriosis.
- 10.2 El Método USDA posee relativa rapidez para la detección de la contaminación por Listeria monocytogenes en quesos.
- 10.3 Las características selectivas y diferenciales del método hacen que sea de utilidad para el aislamiento e identificación de Listeria monocytogenes.
- 10.4 La composición de los quesos pueden afectar la susceptibilidad al desarrollo de la contaminación por Listeria monocytogenes.

## 11. RECOMENDACIONES

- 11.1. Es indispensable la preparación de medios de cultivo con un mayor poder inhibitorio a fin de aumentar la capacidad diferencial y selectiva.
- 11.2. Crear conciencia en los fabricantes de alimentos a fin de sacar al mercado productos de alta calidad microbiológica.
- 11.3. Identificar los puntos críticos en cada fábrica que podrían conducir a una contaminación.
- 11.4. Verificar que el proceso de pasteurización está cumpliendo con su función de eliminar microorganismos patógenos y reducir al máximo la carga microbiana.
- 11.5. Crear programas de limpieza y desinfección a fin de evitar la contaminación de otros lotes de producto.
- 11.6. Darle a la contaminación por L. monocytogenes la debida atención a fin de evitar consecuencias graves a la población.

## 12. REFERENCIAS

- 1) Nicoletti G, Nicolosi UM. Diccionario de Bacteriología Humana. España: Grafesa, 1989. XI+433 p. (p.120-123).
- 2) Ballows A, et al. Manual of Clinical Microbiology. 5th ed. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1991. XIX+1364 p. (p.287-292).
- 3) Sneath P, et al. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology. Baltimore, MD: Wavely Press, 1986. Vols. 3, Vol. 2. XIX+1599 p. (p. 1235-1244).
- 4) Lovett J, Hitchins AD. FDA Bacteriological Analytical Manual; 6th ed. VA: AOAC, 1984. V+501 p.(p. 29.01-29.11).
- 5) Hitchins, AD. FDA Bacteriological Analytical Manual; 7th ed. VA:AOAC, 1992. XIX+529 p. (p. 141-151).
- 6) Doyle MP. Effects of environmental and processing conditions on Listeria monocytogenes. Food Technol. 1988;42:169-171.
- 7) Campden Food & Drink Research Assoc. Effects of freezing on Listeria monocytogenes. Technical Memorandum. 1989;(535):38.

- 8) Buchanan RL, Klawitter LA. Effects of temperature and oxygen on growth of Listeria monocytogenes at pH 4.5. J. Food Science. 1990;55:1754-1756.
- 9) Katoh H. Determination of mean generation time of Listeria monocytogenes. Jap. J. Food Microbiol. 1989;6:135-138.
- 10) Loyett J. Isolation and enumeration of Listeria monocytogenes. Food Technol. 1988;42:172-175
- 11) Mc Clain D, Lee WH. FSIS method for the identification of Listeria monocytogenes from processed meat and poultry products. Laboratory Communication No. 57. U.S. Department of Agriculture, Beltsville MD. 1989.
- 12) Marth EH. Characteristics of disease produced by Listeria monocytogenes. Food Technol. 1988;42:165-168.
- 13) Fabert JM, et al. Listeriosis traced to the consumption of alfalfa tablets and soft cheese. N. Engl. J. Med. 1990;(322):338.
- 14) Cormac GM, Collins JK. Listeriosis. Food Science & Technol. 1991;2:81-93.

- 15) Ryser E, Marth EH. Behavior of Listeria monocytogenes during manufacture and ripening of brick cheese. J. Dairy Sc. 1989;72:838-853.
- 16) Cox L. Listeria deserves a fair trial. Food Microbiol. 1989;6:63-67.
- 17) Stephens JC, et al. Effect of temperature on virulence of Listeria monocytogenes in mice. J. Appl. Bacteriol. 1991;70:239-244.
- 18) Palumbo SA, Williams A. Effects of temperature, relative humidity and suspending menstrua on the resistance of Listeria monocytogenes to drying. J. Food Prot. 1990;53:377-381.
- 19) Gini G, et al. Listeriosis en Guatemala. Reporte del primer caso de listeriosis neonatal. Guatemala Pediatrica. 1986;8:67-72.
- 20) Melauchlin J, Green MH, Pini DN. Occurrency of Listeria monocytogenes on cheeses of manufacturers associated with a case of listeriosis. Intl. J. Food. Microbiol. 1990;10:255-262.
- 21) Hicks SJ, Lund B. Survival of Listeria monocytogenes on Cottage cheese. J. Appl. Bacteriol. 1991;70:308-314.

- 22) Marth EH. Acid environment injury on Listeria monocytogenes. J. Food Prot. 1990;53:26-29.
- 23) Papageorgiou D, Marth EH. Fate of Listeria monocytogenes during manufacture, ripening and store of feta cheese. J. Food Prot. 1989;52:82-87.
- 24) Papageorgiou D, Marth EH. Fate of Listeria monocytogenes during manufacture, ripening and store of blue cheese. J. Food Prot. 1989;52:459-465.
- 25) Wehr HM. Listeria Methodology. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988;71:643.
- 26) Snelling AM, Kerr KG, Heritage J. The survival of Listeria monocytogenes on fingertips and factors affecting elimination of the organism by hand washing and disinfection. J. Food Prot. 1991;54:343-348.
- 27) Genigeorgis C, Toledo JH, Selected Microbiological and Chemical characteristics of illegally produced marketed soft hispanic-style cheeses in California. J. Food Prot. 1991;54:662-667.
- 28) Genigeorgis C, et al. Growth and survival of Listeria monocytogenes in market cheeses stored at 4 to 30 C. J. Food Prot. 1991;54:662-667.

- 29) Lund AM, Zottola EA, Dusch OJ. Comparison of methods for isolation of Listeria from raw milk. J. Food Prot. 1991;54:602-606.
- 30) Kovincic I, et al. Survival of Listeria monocytogenes during manufacture and ripening of trappist cheese. J. Food Prot. 1991;54:418-420.
- 31) El-Gazzar F, Bohner HF, Marth EH. Growth of Listeria monocytogenes at 4, 32 and 40 C in skim milk and in retentate and permeate from ultrafiltrated skim milk. J. Food Prot. 1991;54:338-342.
- 32) Charlton BR, Kinde H, Jensen LH. Survey for Listeria sp. in milk processing plants in California. J. Food Prot. 1990;53:198-201.
- 33) Lovett J, et al. High Temperature-Short Time Pasteurization inactivates Listeria monocytogenes J. Food Prot. 1990;53:734-738.
- 34) Walker RL, et al. Environmental survey for Listeria species in frozen milk product plants in California. 1991;54:178-182.
- 35) Knabel SJ, et al. Effect of growth, temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of Listeria monocytogenes during pasteurization. Appl. & Environ. Microbiol. 1990;56:370-376.



- 36) Bradshaw JG, Peeler JT, Twedt RM. Thermal Resistance of Listeria spp. in milk. J. Food Prot. 1991;54:12-14.
- 37) El-Kest SE, Yousef A, Marth EH. Fate of Listeria monocytogenes during freezing and frozen store. J. Food Science. 1991;56:1068-1071.
- 38) El-Kest SE, Marth EH. Injury & death of frozen Listeria monocytogenes. J. Dairy Sc. 1991;74:1209-1213.
- 39) Lee SH, Frank JF. Inactivation of Listeria monocytogenes with heat and hypochlorite. J. Food Prot. 1991;54:4-6.
- 40) Frank JF, Koff RA. Surface adherent growth of Listeria monocytogenes is associated with increased resistance to surfactant sanitizer and heat. J. Food Prot. 1990;54:550-554.
- 41) Fraser JA, Sperber WH. Rapid detection of Listeria spp. in food and environment by esculin hydrolysis. J. Food Prot. 1998;51:762-765.
- 42) Warburton DW, et al. A comparative study of modified version of the "FDA" and "USDA" methods for the detection of Listeria monocytogenes. J. Food Prot. 1991;54:669-676.

- 43) Lee WH, Mc Clain D. Improved Listeria monocytogenes selective agar. Appl. Environ. Microbiol. 1986;52:1215-1217.
- 44) Conner DE, Scott VN, Bernard DT. Growth, inhibition and survival of Listeria monocytogenes as affected by acidic conditions. J. Food Prot. 1990;53:652-655.
- 45) Bailey JS, Fletcher DL, Cox NA. Efficacy of enrichment media for recovery of heat-injured Listeria monocytogenes J. Food Prot. 1990;53:437-477.
- 46) Windholz M, et al. The Merck Index. 10th ed. USA: Merck & Co., Inc. 1983. (xv + 1463 p).
- 47) Gini GA, Bran MC. Manual de Prácticas de Laboratorio de Microbiología General. Guatemala: Depto de Microbiología, Fac. CC. QQ. Y Farmacia, USAC. 1989.

Anexo 1: Pruebas de tamizaje para la identificación de las especies del género Listeria. (a)

	BETA HEMOLISIS	GRAM	MOVILIDAD EN SOMBRILLA	MOVILIDAD EN GOTA PENDIENTE
<u>L. monocytogenes</u>	(b) +	+	+	+
<u>L. ivanovii</u>	+	+	+	+
<u>L. seeligeri</u>	+	+	+	+
<u>L. innocua</u>	(c) -	+	+	+
<u>L. welshimeri</u>	-	+	+	+
<u>L. grayi</u>	-	+	+	+
<u>L. murrayi</u>	-	+	+	+

- (a) Datos según USDA
- (b) Resultado positivo
- (c) Resultado negativo

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD OF SAN CARLOS DE GUATEMALA  
 GUATEMALA, GUATEMALA

(a)

Anexo 2: Pruebas de identificación de las especies hemolíticas del género Listeria

	MR/VP	REDUCCION DE NITRATOS A NITRITOS		O/F FERMENTACION			BILIS ESCULINA		OXIDASA	CATALASA	CAMP <u>S. aureus/R. equi</u>
		M	R	X	M	R	X				
<u>L. monocytogenes</u>	+/+	(c)	-	(d)	+/+	-	+	-	+	+/-	
<u>L. ivanovii</u>	+/+	-	-	-	+/+	+	+	-	+	-/+	
<u>L. seeligeri</u>	+/+	-	-	-	+/+	+	+	-	+	+/-	

- (a) Datos según USDA.  
(b) M = Manitol; R = Ramnosa; X = Xilosa.  
(c) Resultado Positivo  
(d) Resultado Negativo

## ANEXO 5

### PREPARACION DE MEDIOS:

#### CALDO UVM:

Este medio es esencialmente el medio que fue desarrollado por Donnelly y Baigent en la Universidad de Vermont. Este difiere de la fórmula original en que contiene la mitad de la cantidad de ácido nalidíxico.

Proteosa Peptona	5 g
Triptona	5 g
Polvo Lab Lemco (Extracto de carne)	5 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	20 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.35 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	12 g
Esculina	1 g
Acido Nalidíxico (2% en NaOH 0.1 M)	1 ml
Acriflavina	12 mg
Agua destilada	1 l

Esterilizar a 121 C por 15 minutos. Si el medio se oscurece ha sido sobrecalentado y debe descartarse. Almacenar en refrigeración.

### CALDO FRASER:

Este caldo es idéntico en fórmula al descrito anteriormente, excepto por un incremento de acriflavina (0.1 ml de solución 2.5 mg/ml), lo que aumenta su selectividad, y la adición de cloruro de litio y citrato férrico amónico (0.1 de solución al 5%), que produce un ennegrecimiento del medio cuando se presenta hidrólisis de la esculina. Estas soluciones deben ser esterilizadas por filtración.

Después de mezclar los ingredientes, se depositan 10 ml del medio en tubos con tapa de rosca. Se esterilizan a 121 C por 15 minutos y se almacenan en refrigeración. La cantidad extra de acriflavina y la cantidad de citrato férrico amónico deben efectuarse después de la esterilización, antes de su uso.

### MODIFIED OXFORD MEDIUM (MOX):

Este es una modificación del Medio Oxford desarrollado por Curtis, et al.

Agar Base Columbia	39-44 g
Agar	2 g
Esculina	1 g
Citrato férrico amónico .	0.5 g
Cloruro de litio	15 g
Colistina 1%	1 ml
Agua destilada	1 l

Después de mezclar bien, ajustar el pH a 7.2. Esterilizar a 121° C por 10 minutos, enfriar a 46 C. Agregar 2 ml de solución de Moxalactam 1%, mezclar bien y poner 12 ml de medio en cada caja de Petri.

Solución de Colistina 1%

Colistina, Metano Sulfonato	1 g
Buffer de Fosfato de Potasio 0.1 M	100 ml

Esta solución no es estéril, por lo que se debe almacenar en alícuotas de 3 a 5 ml a -20 C o a temperatura más baja.

Solución de Moxalactam 1%

Moxalactam sodio (o amonio)	1 g
Buffer de Fosfato de Potasio 0.1 M	100 ml

Disolver, esterilizar por filtración, almacenar en alícuotas de 2 ml a -20 C o a temperatura más baja.

#### MEDIO SANGRE DE CABALLO:

Agar base Columbia 1 l; preparado bajo especificaciones del productor

Esterilizar a 121 C por 15 minutos. Poner 10 ml en cada caja de Petri. Dejar solidificar y aplicar 5 o 6 ml de agar base Columbia con 5% de sangre de caballo. Almacenar en refrigeración.

### AGAR PARA PRUEBA DE CAMP:

Se utiliza agar tripticasa soya conteniendo 5% de sangre de carnero. Almacenar las cajas en refrigeración. Descartar cualquier caja con agar decolorado.

### CALDO PARA FERMENTACION DE CARBOHIDRATOS:

Base para fermentación de carbohidratos

Ajustar el pH a 7.4 colocar 9 ml en cada tubo y esterilizar a 121 C por 15 minutos. A cada tubo agregar 1 ml de solución de carbohidrato:

Xilosa 5%

Manitol 10%

Rhamnosa 5%

Estas soluciones deben ser esterilizadas previamente por filtración. Almacenar en refrigeración.

### MEDIO BILIS ESCULINA:

Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
Bilis de buey	40 g
Esculina	1 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH de 6.4 a 6.8. Esterilizar a 121 C por 15 minutos.



## ANEXO 6

### PROCEDIMIENTOS:

#### MOVILIDAD EN GOTA PENDIENTE:

Utilizar un portaobjetos completamente limpio, agregar una gota de solución salina al 0.85% y colocar unas colonias sospechosas.

#### MR-VP:

A los tubos sembrados en MR-VP, tratarlos de la siguiente manera, para la determinación de acetil-metil-carbinol:

Decantar en un tubo de ensayo limpio 1 ml del caldo MR-VP. Agregar luego 0.6 ml de solución de alfa naftol (solución A) y 0.2 ml de la solución de KOH al 40% (solución B). Agitar después de la adición de cada reactivo y dejar a temperatura ambiente durante 5 a 15 minutos sin tapar. La aparición de un color rosado a rojo indica la presencia de acetil-metil-carbinol. La solución alcohólica de alfa naftol es esencial, debido a que actúa como un intensificador del color, con incremento de la sensibilidad de la reacción. El KOH actúa como un agente oxidante, apresurando la oxidación de acetoina a diacetilo.

Agregar 5 gotas del indicador rojo de metilo al sobrante de caldo MR-VP que quedara en el tubo inicial. La aparición de un color rojo o rosado indica una prueba positiva de rojo de metilo y significa que el medio se torna ácido.

#### PRUEBA DE OXIDACION/FERMENTACION DE GLUCOSA (O/F):

Inocular dos tubos del medio OF habiendo agregado previamente la cantidad estipulada de solución de glucosa al 5% preparada por filtración. Puncionar el medio de una sola vez hasta el fondo con el asa recta. Cubrir uno de los tubos con aceite mineral estéril (fermentación) y dejar el otro sin aceite (oxidación).

Incubar los tubos por 48 horas a 37 C.

#### REDUCCION DE NITRATOS A NITRITOS:

Sembrar los tubos en caldo nitrado con cada una de las cepas sospechosas. Incubar los tubos a 37 C durante 48 horas. Agregar a cada tubo, 0.5 ml de ácido sulfanílico y 0.5 ml de alfa-naftilamina. La presencia de nitritos se indica por la aparición de un color rosado o rojo.

#### PRUEBA DE OXIDASA:

La prueba a utilizar es el producido por DIFCO.

#### PRUEBA DE CATALASA:

Utilizar un portaobjetos limpio al cual se le agrega una gota de peróxido de hidrógeno y unas colonias sospechosas. La emisión de burbujas indican un resultado positivo.

## TINCIÓN DE GRAM:

Hacer una preparación de cultivo con una gota de agua destilada y varias colonias sospechosas y fijar a la llama. Cubrir las preparaciones con solución de cristal violeta durante 1 minuto. Lavar muy breve y suavemente con agua corriente. Escurrir la lámina y cubrirla con solución de lugol durante 1 minuto. Lavar con agua corriente. Gotear alcohol-acetona sobre la preparación y lavar inmediatamente. Cubrir la lámina con solución de safranina durante un minuto. Lavar con agua, escurrir y secar cuidadosamente con papel secante o al aire.

## ANEXO 7

### REACTIVOS

#### MR-VP

##### Solución de Rojo de Metilo:

Rojo de Metilo	0.1 g
Alcohol etílico 95%	300 ml

##### Voges-Proskauer:

###### Solución A:

Alfa naftol	5 g
Alcohol etílico absoluto	100 ml

###### Solución B:

KOH	40 g
Agua destilada	100 ml

### REDUCCION DE NITRATOS:

#### Solución A:

Acido sulfanílico	8 g
Acido acético 5N	1 l

1 parte de ácido acético glacial para 2.5

partes de agua destilada.

Solución B:

Naftilamina	6 g
Acido acético 5N	1 l

TINCION DE GRAM:

Cristal Violeta:

Cristal Violeta (90% colorante)	2 g
Alcohol etilico 95%	20 ml
Oxalato de amonio	0.8 g
Agua destilada	80 ml

Mezclar las dos soluciones, filtrar después de 24 horas.

Lugol:

Yodo cristalizado	1 g
Yoduro de potasio	2 g
Agua destilada	300 ml

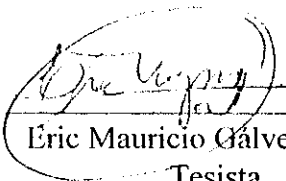
Alcohol acetona:

acetona	10 ml
alcohol etilico 95%	20 ml

Safranina:

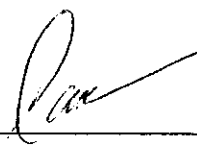
safranina	0.5 g
alcohol etilico 95%	100 ml

Hacer una solución 1:10 con agua destilada.



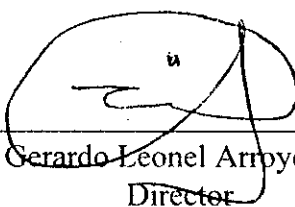
---

Eric Mauricio Gálvez Matute  
Tesisista



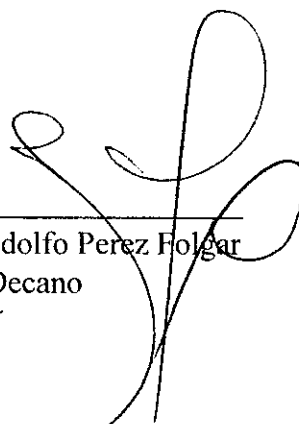
---

Licda. Sheryl de Cabrera  
Asesora



---

Lic. Gerardo Leonel Arroyo Catalán  
Director



---

Lic. Jorge Rodolfo Perez Folgar  
Decano

