

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN LECHE DE VACA
NO PASTEURIZADA Y COMERCIALIZADA EN LOCALIDADES DE
SAN JOSÉ PINULA, ANTIGUA GUATEMALA Y EN LA FACULTAD
DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

ANABELLA GONZÁLEZ JUÁREZ DE CONDE

QUÍMICA BIÓLOGA

Guatemala, septiembre de 2008

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

**DETERMINACIÓN DE *Listeria monocytogenes* EN LECHE DE VACA
NO PASTEURIZADA Y COMERCIALIZADA EN LOCALIDADES DE
SAN JOSÉ PINULA, ANTIGUA GUATEMALA Y EN LA FACULTAD
DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**Informe de Tesis
ANABELLA GONZÁLEZ JUÁREZ DE CONDE**

**Para optar al título de
QUÍMICA BIÓLOGA**

Guatemala, septiembre de 2008

MIEMBROS DE JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph.D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto	Secretario
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	Vocal I
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	Vocal III
Br. Andrea Alejandra Alvarado Álvarez	Vocal IV
Br. Aníbal Rodrigo Sevillanos Cambronero	Vocal V

ACTO QUE DEDICO

A Dios, a Jesús y a la Santísima Virgen María, por regalarme una vida llena de bendiciones, por escuchar mis oraciones y por darme la sabiduría y fortaleza necesarias para alcanzar este triunfo.

A los mejores padres del mundo, Juan y Thelma Yolanda, a quienes quiero con toda mi alma y son mi mayor bendición. Mil gracias por su amor y comprensión, por todo su esfuerzo y dedicación, por su paciencia y sabios consejos, pero sobretodo por apoyarme y creer en mí. Que Dios los bendiga hoy y siempre.

A mis hermanos, Juan Gerardo y Glenda Nineth, por todo el cariño y apoyo que me han brindado siempre. Los quiero mucho y gracias por estar compartiendo conmigo este triunfo.

A mi esposo y gran amor, Fernando Conde, por su paciencia, amor y comprensión, por sus consejos y apoyo incondicional. Mil gracias por creer en mi sueño y ayudarme a realizarlo.

A mis tíos, pero en especial a mi tía Lety, porque no lo hubiera logrado sin su apoyo, su amor y sabios consejos. Para usted todo mi cariño y admiración y mis más sinceros agradecimientos. También a mi tío Randy (†), porque sé que desde el cielo está compartiendo esta alegría conmigo.

A mis abuelitos, Eliseo y Gertrudis, con todo mi amor, en especial a mamá Leandra (†) y papá Yayo (†), que aunque hoy no pueda ver su expresión de alegría, sé que se están gozando mi triunfo desde el cielo.

A mi familia política que siempre me apoyó y me animó a seguir adelante. Gracias por su cariño y sus consejos ilimitados.

A mis grandes amigas y compañeras de promoción, Isabel, María Mercedes y Ana, gracias por su amistad sincera, por todos los momentos compartidos, sus palabras de ánimo y su apoyo constante.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, entidad educativa que me forjó profesionalmente.

Mis más sinceros agradecimientos a mi asesora de tesis Licda. Brenda López de Quevedo, por su amistad sincera, sabios consejos, apoyo incondicional y su valiosa asesoría profesional en la realización del presente trabajo de tesis. Para usted mi mayor admiración por su gran fortaleza y gran corazón. Que Dios la bendiga.

A mis revisores Licda. María Luisa García de López y Dr. Roberto Flores Arzú, muchas gracias por brindarme todo su apoyo y experiencia profesional durante la elaboración de mi tesis.

Al Lic. Juan Carlos Quevedo (†), a quien agradezco de todo corazón su amistad, apoyo y ayuda profesional. Y porque sé que hoy esta compartiendo este triunfo conmigo, quiero que sepa que personas como usted, hacían de este mundo un lugar mejor para vivir.

A la Unidad de Comercialización de la Escuela de Zootecnia de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, en especial a la Licda. Zea por el apoyo que me brindó en la realización de este trabajo de tesis.

A la Licda. Ana Rodas, a Eugenia Garzaro, con todo mi cariño. Gracias por su apoyo y amistad.

A todas aquellas personas e instituciones que de una u otra forma me apoyaron durante la elaboración de mi tesis.

ÍNDICE

	Pág.
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	5
A. La Leche	5
1. Generalidades	5
2. Microbiota normal de leche cruda	5
3. Fuentes de contaminación de la leche cruda	6
4. Enfermedades transmitidas por la leche	9
5. Control de enfermedades transmitidas por la leche	11
6. Tratamiento térmico de la leche	14
7. Productos lácteos	18
8. El sector lácteo en Guatemala	18
B. Genero <i>Listeria</i>	19
1. Características morfológicas, bioquímicas y serológicas	19
2. Hábitat y condiciones ambientales de crecimiento	20
3. Determinantes de patogenicidad	20
4. Epidemiología	21
5. Asociación con alimentos	27
6. Patogenia y manifestaciones clínicas	29
7. Tratamiento	31
8. Prevención clínica	31
9. Identificación de riesgos microbiológicos	31
10. Programas de prevención industrial	33
11. Métodos de análisis de <i>L. monocytogenes</i>	34
IV. JUSTIFICACIÓN	37

V.	OBJETIVOS	38
VI.	HIPÓTESIS	39
VII.	MATERIALES Y METODOS	40
VIII.	RESULTADOS	52
IX.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	58
X.	CONCLUSIONES	67
XI.	RECOMENDACIONES	68
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
XIII.	ANEXOS	78

I. RESUMEN

La leche cruda es uno de los alimentos ampliamente vinculados a la transmisión de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, causante de listeriosis. Durante años, muchos productores guatemaltecos se han dedicado a la comercialización de lácteos como fuente principal de ingresos, sin someterla a controles microbiológicos ni procesos de pasteurización, lo que representa un riesgo potencial para la población consumidora.

En Guatemala, no se tiene un conocimiento claro de la situación epidemiológica de *L. monocytogenes* debido al limitado número de investigaciones en torno a ella, por lo que el objetivo de este trabajo, fue determinar su presencia en la leche de vaca que se comercializa sin pasteurizar en localidades de San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Para este propósito se analizaron 75 muestras de leche cruda provenientes de fincas y centros de acopio en las localidades mencionadas (25 muestras por localidad), utilizando la metodología propuesta por el Instituto Nutricional de Centroamérica y Panamá (INCAP), estandarizada con la cepa ATCC 19115 de *L. monocytogenes*.

Los resultados de la entrevista mostraron que la limpieza inadecuada de las áreas de ordeño, la utilización de agua no potable, la falta de capacitación y supervisión constante de los empleados sobre las buenas prácticas de higiene, el mantenimiento inadecuado de la cadena de frío y la forma en que se traslada la leche para su distribución y venta, pueden ser algunos factores de riesgo que podrían favorecer la contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes* en los sitios evaluados. Las principales fuentes de contaminación podrían ser los recipientes en donde se recolecta y almacena la leche, el agua que utilizan para realizar las labores del ordeño y el personal que manipula la leche, entre otros.

Los resultados obtenidos en el análisis microbiológico, evidenciaron que de las 75 muestras analizadas, el 12 % fueron positivas para *Listeria* spp. De ellas, el 9.33 % se identificaron como *L. innocua* y el 2.67 % como *L. welshimeri*, no evidenciándose la

presencia de *L. monocytogenes*. En cuanto a su procedencia, el 6.67 % pertenecieron a la Unidad de Comercialización, el 4 % a San José Pinula y el 1.33 % a Antigua Guatemala. Estos resultados fueron confirmados con las pruebas comerciales API *Listeria* y BBL Crystal.

La presencia de *L. innocua* y *L. welshimeri*, indica una inadecuada manipulación de la leche y condiciones higiénicas deficientes en las lecherías, lo que aumenta la probabilidad de desarrollo de *L. monocytogenes*. Asimismo, la ausencia de *L. monocytogenes* muestra que la leche cruda cumple con las normas legales establecidas en Guatemala, en cuanto a la cero tolerancia de este microorganismo. Sin embargo, sí representa un riesgo potencial para la población consumidora, debido a la presencia de otras especies del género.

En base a los resultados obtenidos en este estudio, la Unidad de Salud del Bienestar Estudiantil de la Universidad de San Carlos de Guatemala, puede continuar desarrollando esta metodología en otras regiones del país para determinar la inocuidad de la leche cruda y además implementar programas de capacitación y supervisión sobre buenas prácticas de manufactura para prevenir el desarrollo de listeriosis en personas susceptibles.

II. INTRODUCCION

Actualmente, las enfermedades de transmisión alimentaria -ETA's- constituyen un peligro para la salud humana, debido a que los productos alimenticios representan la fuente principal de riesgo respecto de los agentes biológicos y afectan a todos los países independientemente de su nivel de desarrollo. La Organización Mundial de la Salud -OMS-, ha notificado siete patógenos principales que se encuentran involucrados en estas enfermedades: *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Toxoplasma gondii* y *Listeria monocytogenes*, los cuales son causantes entre 3.3 a 12.3 millones de casos y alrededor de 3,900 muertes en Estados Unidos de América (1, 2).

L. monocytogenes es de gran importancia entre los patógenos emergentes asociados a las ETA's, debido a su amplia distribución en la naturaleza y porque ha sido aislada de varias especies de animales y una amplia variedad de productos alimenticios frescos y procesados, como la leche cruda no pasteurizada, leche en polvo, quesos, helados, verduras y legumbres crudas, productos cárnicos, entre otros. Además, es resistente a diferentes condiciones ambientales como el alto contenido en sal (hasta un 10 %) o acidez (pH entre 4.5 y 9.2) y sobre todo tiene la capacidad de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en alimentos refrigerados o congelados, logrando que se constituya en una seria amenaza para la salud humana, ya que produce una enfermedad conocida como listeriosis. Cabe mencionar que *L. monocytogenes* no sobrevive al proceso de pasteurización (3, 4).

A pesar de que la listeriosis ocurre de manera infrecuente (3 a 5 casos por millón de habitantes por año en Estados Unidos de América), entre el 20 y el 30 % de los casos tanto epidémicos como esporádicos da lugar a defunciones. La proporción de fatalidad es mayor (38 a 45 %) en individuos altamente susceptibles como personas inmunodeprimidas, mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y pacientes con problemas inmunológicos. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son variadas incluyendo diarrea, meningitis, septicemia, abortos espontáneos, entre otros (5).

En Guatemala se han realizado dos investigaciones, la primera determinó la presencia de *L. monocytogenes* en 3 de 100 muestras de camarón de exportación y consumo local y la otra, en 5 de 91 muestras de queso de producción comercial (6, 7).

Considerando que la presencia de esta bacteria en la leche cruda podría en algún momento representar un riesgo potencial para la salud pública, ya que ésta se consume a veces sin tratamiento térmico o incluso se utiliza como materia prima para la fabricación de otros productos lácteos, es necesario determinar su presencia en este producto alimenticio.

Por lo mencionado, esta investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de *L. monocytogenes* en la leche de vaca cruda que se comercializa en la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y en lecherías o centros de acopio ubicados en los municipios de San José Pinula y Antigua Guatemala. Para ello se analizaron 75 muestras de leche, utilizando la metodología propuesta por el Instituto Nutricional de Centroamérica y Panamá (INCAP), con el propósito de establecer si este producto es una posible fuente del microorganismo y que su consumo pueda poner en riesgo la salud de la población susceptible. Adicionalmente, se notificaron los resultados a las localidades bajo estudio y al Departamento de Control de Alimentos y Medicamentos del Ministerio de Salud y Asistencia Social.

III. ANTECEDENTES

A. La Leche

1. Generalidades

La leche líquida ocupa una posición dominante a nivel mundial en relación al procesamiento, comercialización y consumo lácteo. Esto se debe a que la leche líquida es un alimento básico en muchas sociedades donde la ganadería lechera es una parte importante del sistema de producción agrícola. La forma en que la leche es presentada para la venta, va desde la comercialización de leche cruda en la mayoría de los países en desarrollo, así como también la leche pasteurizada tradicional y la leche “comercialmente estéril” a la cual se le aplica el proceso UHT (Ultra High Temperature = temperatura ultra elevada), en países con industrias lecheras desarrolladas (8).

El tipo principal de leche que se consume en la mayoría de los países es la leche de vaca, aún cuando las leches de cabra, búfalo, oveja y camello también son consumidas. La leche de vaca, es uno de los alimentos más nutritivos puesto que posee un alto contenido de proteínas (3.4 % principalmente caseína, con pequeñas cantidades de lactoalbúmina y lactoglobulina) de alta calidad que proporcionan los diez aminoácidos esenciales, carbohidratos (4.8 %, en forma de lactosa), grasas en suspensión (3.7 %) y un 88.1 % de agua. Además, contribuye a la ingesta calórica diaria total, como también, aporta inmunoglobulinas y otros micronutrientes (3, 9-11).

2. Microbiota normal de la leche cruda

Las bacterias no patógenas más abundantes que forman parte de la microbiota normal de la leche cruda, son las bacterias ácido lácticas que pertenecen a la familia *Lactobacillaceae* – *Streptococcaceae*. Algunos miembros de la familia *Streptococcaceae* producen enfermedades en humanos (por ejemplo, *Streptococcus pneumoniae*). Los

restantes miembros de la familia son de gran importancia en la microbiología aplicada y en especial en la microbiología de los productos lácteos. Los principales organismos en este grupo que se encuentran formando parte de la microbiota característica de la leche son *Streptococcus lactis*, *S. cremoris* y varias especies del género *Lactobacillus* como es el caso de *Lactobacillus casei*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* y *L. brevis*. Estos organismos no producen enfermedad en los humanos, pero fermentan los carbohidratos de la leche para formar ácidos, disminuyendo de esta forma su pH, dando como consecuencia la precipitación de la caseína al mismo tiempo que le confiere un sabor agrio a la leche. Otras bacterias que por lo general se encuentran en la leche cruda no pasteurizada, son los miembros de los géneros: *Micrococcus* sp, *Pseudomonas* sp, *Staphylococcus* sp y *Bacillus* sp (12).

3. Fuentes de contaminación de la leche cruda

La leche cruda resulta ser muy perecedera, pues su estado líquido y su composición nutritiva la hacen muy propensa a alterarse por la acción de los microorganismos que originalmente contiene o que se introducen al manejarla de manera inadecuada. A menos que la vaca esté enferma, la leche es estéril hasta que alcanza los conductos galactóforos en la ubre de la vaca, pero debido a que los conductos contienen bacterias, la primera porción de leche que sale de la ubre siempre contienen microorganismos. Sin embargo, ésta no es la principal fuente de bacterias en la leche. La mayor parte de las bacterias provienen de las cubetas donde se recolecta la leche, del equipo de la lechería, de la contaminación de los corrales, del personal y de fuentes similares. Por esta razón, a los microorganismos que se encuentran en la leche se les han dado tres orígenes principales: el interior de la ubre, el exterior de los pezones y por último, el ordeño y los utensilios que se utilizan para manipular la leche (3, 12, 13).

Los microorganismos que pueden alcanzar la ubre, igualmente pueden llegar a contaminar la leche antes o después del ordeño. Estos microorganismos pueden alcanzar la leche por vía mamaria ascendente o descendente. Por vía ascendente lo hacen bacterias que

se adhieren a la piel de la ubre y posterior al ordeño entran a través del esfínter del pezón (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* sp y coliformes). La vía descendente o hematógena la utilizan los microorganismos que pueden causar enfermedad sistémica o tienen la propiedad de movilizarse por la sangre y a través de los capilares mamarios llegar a infectar la ubre (*Salmonella* sp, *Brucella* sp, *Mycobacterium tuberculosis*) (14, 15).

La contaminación de la leche puede ocurrir una vez que esta ha sido extraída de la glándula mamaria. Los utensilios, tanques de almacenamiento, transporte e incluso el personal que manipula la leche, son fuentes de contaminación de microorganismos que utilizan esta vía que, en algunos casos son las más abundantes y a la vez son los causantes de grandes pérdidas en la calidad del producto (15).

a. Principales vías de entrada de microorganismos contaminantes de la leche

- 1) **El animal:** teóricamente la leche al salir del pezón debería ser estéril, pero siempre contiene de 100 a 10,000 Unidades Formadoras de Colonias por mililitro (UFC/ml), una baja carga microbiana que puede llegar a multiplicarse si la leche es manipulada inadecuadamente. Los microorganismos pueden entrar por vía mamaria ascendente a través del esfínter del pezón, es por ello que cualquier lesión que afecte la integridad del mismo, facilitará un aumento en la contaminación. La leche puede también contaminarse al salir por medio de pelos que se desprenden de los animales. La ubre está en contacto con el suelo, heno, y cualquier superficie donde las vacas se echen, de allí que los pezones sean considerados como una fuente importante de esporas bacterianas. En animales enfermos (vacas con mastitis) aumenta el número de microorganismos en leche (3, 15).
- 2) **Aire:** el aire representa uno de los medios más hostiles para la supervivencia de los microorganismos debido a la constante exposición al oxígeno, cambios de temperatura y humedad relativa, radiación solar, etc. Es por ello que sólo

aquellos microorganismos resistentes podrán ser capaces de permanecer en el aire y llegar a contaminar los alimentos. Los microorganismos Gram negativo mueren rápidamente mientras que los Gram positivo y aquellos esporulados pueden persistir por largo tiempo (15).

- 3) **Agua:** el agua utilizada para la limpieza de los equipos y utensilios de ordeño, la higiene del animal y del personal, debe ser lo más limpia posible. El agua puede ser una fuente importante de microorganismos psicrófilos (*Pseudomonas* sp.) y de bacterias coliformes (15).
- 4) **Suelo:** el suelo es la principal fuente de microorganismos termodúricos y termófilos. La leche nunca entra en contacto con el suelo pero si los animales, utensilios y personal, de manera que es a través de ellos que los microorganismos telúricos (*Clostridium* sp) pueden alcanzar a contaminar la leche (15).
- 5) **El ordeñador:** el ordeñador puede llegar a jugar un papel importante en la contaminación de la leche, sobre todo cuando el ordeño es manual. En nuestro medio es frecuente observar como el personal encargado del ordeño no se lava las manos y peor aún, se las humedece en la misma leche para lograr lubricación que facilite el ordeño. Se ha señalado al ordeñador como responsable de la contaminación de la leche con microorganismos patógenos (*S. aureus*, *E. coli*, *M. tuberculosis*, *Streptococcus* sp., *L. monocytogenes*, etc.). Las heridas infectadas en manos y brazos pueden ser fuentes de algunos de estos microorganismos (3).
- 6) **Estiércol:** el estiércol es la fuente principal de microorganismos coliformes. Estos pueden alcanzar la leche a través del animal o del ordeñador así como también por medio de los utensilios mal higienizados (15).

- 7) **Utensilios y transporte:** el contacto de la leche con el material de ordeño y su permanencia en los tanques y transporte puede multiplicar por un factor de 2 a 50 la microbiota presente. De allí que la higiene adecuada de éstos, por medio de agentes desinfectantes, afecta significativamente la calidad sanitaria de la leche. La microbiota proveniente de esta fuente puede ser diversa, pero la más frecuente es la termorresistente, razón más que suficiente para exigir al máximo la higiene (3, 15).

4. Enfermedades transmitidas por la leche

Las enfermedades que se transmiten al ser humano a través del consumo de leche cruda no pasteurizada son numerosas y pueden ser de origen bacteriano, virales y las provocadas por rickettsias. Las mismas se dividen en dos categorías principales: 1) enfermedades provocadas por microorganismos que infectan a la vaca y que luego se incorporan a la leche y 2) enfermedades que se originan de la contaminación de la leche por fuentes en las que participa el ser humano (12).

Los ejemplos mejor conocidos del primer grupo son la tuberculosis bovina y la brucelosis. También se incluyen la escarlatina y la faringitis estreptocócica las cuales se transmiten a los humanos a partir de vacas infectadas con *Streptococcus pyogenes*. En forma similar, *S. aureus* puede infectar a la vaca y provocar una intoxicación alimentaria en el ser humano. La enfermedad producida por rickettsias (fiebre Q), también se transmite a los humanos por medio del consumo de la leche de vacas infectadas o por inhalar polvo o excremento seco proveniente de pasturas o corrales infectados. Asimismo, se menciona a la listeriosis, una enfermedad grave y con frecuencia mortal que también se transmite a través de la leche contaminada con la bacteria *L. monocytogenes*. En el segundo grupo de enfermedades se incluye la salmonelosis (infección causada por *Salmonella* sp), la shigelosis o disentería bacilar (causada por *Shigella* sp) y la difteria (causada por *Corynebacterium diphtheriae*). *Campylobacter jejuni* también provoca numerosos casos de gastroenteritis, siendo su particularidad la ingestión de leche cruda (12).

Cabe mencionar, que varios de los microorganismos mencionados, son causa de una infección localizada en la ubre o en los conductos galactóforos del ganado lechero denominada mastitis. No obstante, debido a la extensión y gravedad de los problemas que provoca actualmente esta enfermedad en el ganado lechero tanto en el orden de la salud como en el económico, es necesario dedicarle una sección especial (16).

a. La mastitis

La mastitis es una inflamación o irritación de la glándula mamaria producida por diversos agentes, principalmente de tipo infeccioso, caracterizándose por cambios físicos y químicos en la composición de la leche y ocasionando alteraciones patológicas localizadas en la mama. La enfermedad puede desarrollarse en diferentes formas: aguda, subaguda o crónica (16).

En el desarrollo de la mastitis pueden intervenir numerosos microorganismos como bacterias, levaduras, mohos, virus y otros agentes. Los que participan con mayor frecuencia son: *S. aureus*, *E. coli*, *S. agalactiae*, *Streptococcus dysagalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Corynebacterium pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*. También en ocasiones han sido citados como agentes de mastitis otros patógenos como *Salmonella* sp, *L. monocytogenes*, *Mycobacterium bovis* y *M. tuberculosis* (3, 16).

La leche cruda obtenida asépticamente de una vaca sana normalmente contiene pocos microorganismos, menos de 10^2 - 10^3 UFC/ml y la leche extraída de uno o varios de los cuatro pezones que tiene la ubre de la vaca, puede ser estéril. No obstante, los recuentos son más elevados debido a la mastitis, en donde el recuento de bacterias en la leche mamática durante la fase aguda de la enfermedad, puede sobrepasar las 10^8 UFC/ml (3).

Existen dos tipos de mastitis, que se diferencian por la presencia (mastitis clínica) o ausencia (mastitis subclínica) de signos o síntomas de la enfermedad. En cuanto a su diagnóstico, la mastitis **clínica**, puede ser detectada fácilmente por sus manifestaciones

aparentes y cualquier ordeñador con algo de experiencia puede reconocerla. No sucede lo mismo con la mastitis **subclínica** y por esto, la gravedad del problema es mayor. En primer lugar, porque son pocos los que conocen en su real magnitud, la gran difusión de este tipo de mastitis y su incidencia en la salud y la economía. Debido a esto, se hace necesario insistir sobre la importancia de este tipo de mastitis, teniendo en cuenta que se presentan entre 15 a 40 veces más que las mastitis clínicas, a las que normalmente preceden. Por otra parte, las mastitis subclínicas son de duración larga y difíciles de diagnosticar, rebajan el volumen de producción y provocan nocivos efectos en la calidad (16).

En España, septiembre de 2003, se aisló *L. monocytogenes* como causante de una mastitis subclínica de una vaca que estaba en su tercera lactación. A inicios de diciembre de ese mismo año, se detectó esta bacteria en otra vaca que estaba en su sexta lactación, sin aplicar ningún tipo de tratamiento. Ninguna de las vacas manifestó síntomas locales o generales durante el período de estudio, cursando la infección de manera subclínica. Esto significa que existe un riesgo sanitario a tener en cuenta, particularmente cuando se consume directamente leche procedente del tanque o se utiliza leche cruda para elaboración de derivados lácteos (17).

En muchos países los programas de sanidad animal no contemplan el control de la mastitis. Posiblemente, esto se deba a que no se ha demostrado a las autoridades pertinentes, el daño que produce esta enfermedad, para así iniciar programas de control a nivel nacional. A lo anterior, debe sumarse el poco interés del productor lechero por dar solución a este problema, debido a que no es una enfermedad que les produzca impacto y alarma, sobretodo, si sólo se percata de los animales que sufren mastitis clínica (16).

5. Control de las enfermedades transmitidas por la leche

Para el control específico de las enfermedades transmitidas por la leche pueden emplearse dos técnicas generales. Estas técnicas son 1) la inspección del ganado y la eliminación de los animales infectados y 2) la destrucción de los agentes patógenos

mediante el proceso de pasteurización o esterilización. En los Estados Unidos, la inspección del ganado se encarga de investigar principalmente dos enfermedades, la tuberculosis bovina y la brucelosis. Para poder diagnosticarlas, se realizan pruebas cutáneas en todo el ganado lechero, utilizando material derivado de los microorganismos que provocan ambas enfermedades y cualquier vaca que muestre una reacción alérgica a alguno de estos materiales se clasifica como portadora de la enfermedad correspondiente y se sacrifica (12).

Asimismo, se investiga la presencia de mastitis en las vacas determinando el número de glóbulos blancos presentes en la leche. Las infecciones existentes pueden ser eliminadas por recuperación espontánea, eliminación del animal o por tratamiento con antibióticos. Lo más recomendable para erradicar la mayoría de las enfermedades existentes, es el empleo de la terapia con antibióticos (12, 16).

Otra forma de controlar las enfermedades que se transmiten por la leche es adoptando medidas adecuadas en las lecherías que permitan eliminar las principales fuentes de contaminación de la leche. Si bien el lavado de los pezones de la ubre, previo al ordeño, es fundamental para obtener una leche de buena calidad microbiológica, no lo es menos el medio ambiente, el equipo de ordeño y de almacenamiento de la leche, ya que frecuentemente suelen ser la fuente más importante en cuanto a contaminación microbiana se refiere. Dentro de lo que es medio ambiente, es importante considerar al ordeñador y el agua disponible (16).

El ordeñador puede transmitir microorganismos patógenos, si es que se encuentra enfermo, actuando de vector al tomar contacto con superficies, utensilios, etc., luego que éstos han sido desinfectados, o por el empleo de malas técnicas de ordeño, como el humedecimiento de las manos con los primeros chorros de leche (ordeño manual), no lavar las pezoneras luego de su caída al suelo y previo a su colocación (ordeño mecánico), entre otros. En cuanto al equipo de ordeño, si éste tiene un adecuado diseño, correcta instalación y buena higiene, no debe presentar un elemento preocupante en cuanto a contaminación

microbiana. Su diseño y montaje es uno de los factores que incidirá sobre la facilidad de limpieza y en consecuencia, sobre la multiplicación de microorganismos en la instalación. Por ello, el objetivo primordial en toda instalación y sala de ordeño es la sencillez, evitando en lo posible todo elemento que implique ser desarmado para su limpieza; en el caso en que no sea factible, hay que asegurar que su desarme y montaje resulte fácil. Para el caso de ordeño a mano es recomendable el uso de recipientes de boca estrecha y con tapa, con el objeto de disminuir la posibilidad de caída de sustancias extrañas a la leche. Previo al uso del equipo, éste debe estar completamente limpio, al finalizar el ordeño tiene que lavarse y desinfectarse empleando exclusivamente detergentes y desinfectantes aprobados y en una concentración adecuada. El agua utilizada para la limpieza de los equipos y utensilios de ordeño, la higiene del animal y del personal, debe ser lo más limpia posible (de preferencia potable), ya que puede ser una fuente importante de microorganismos patógenos (16).

Otro aspecto a considerar, es la utilización de la refrigeración como medida para conservar la leche cruda. En los países más desarrollados, la leche es almacenada en contenedores antes de ser transportada por medio de un camión refrigerado hasta el centro de acopio, en donde se almacena en tanques bajo refrigeración hasta que se utiliza. Durante este tiempo, su temperatura permanece por debajo de los 7 °C por lo que los únicos microorganismos capaces de desarrollarse son los denominados psicrótrofos, los cuales provocan defectos en la leche por desdoblamiento de la grasa y las proteínas. Dentro de éstos microorganismos se encuentran *Pseudomonas* sp, *Achromobacter* sp, *Alcaligenes* sp, *Micrococcus* sp, *Listeria* sp, entre otros. Su desarrollo es muy rápido, teniendo un tiempo de generación de 6 a 8 horas a 4 °C, pudiendo de esta manera multiplicar su población diez veces, en un término de 24 horas. Su importancia radica en la capacidad que tienen de segregar lipasas y proteasas termorresistentes cuando se multiplican en la leche. Aunque los microorganismos productores de lipasas pueden ser finalmente destruidos, no sucede lo mismo con sus enzimas, pudiendo actuar posteriormente a los tratamientos térmicos. Esto provoca grandes problemas a la industria láctea, especialmente aquellas dedicadas a la "esterilización comercial" de leche y productos lácteos mediante el proceso UHT, ya que las enzimas resistentes al tratamiento disponen de largos períodos para actuar (3, 16).

Gran parte de las enfermedades que todavía se transmiten a través de la leche, pueden controlarse satisfactoriamente mediante los procesos de pasteurización o esterilización (12).

6. Tratamiento térmico de la leche

Como se mencionó en los incisos anteriores, aunque la leche cruda debe estar prácticamente libre de bacterias en el momento en que se obtiene de una vaca sana, es casi imposible mantenerla en esta condición. Por tal razón, la mayor parte de la leche para consumo humano, es tratada con calor para prevenir riesgos de salud pública causados por microorganismos patógenos presentes en la misma. En los países en desarrollo, una proporción significativa de la leche es producida por lecherías artesanales y vendida directamente al consumidor, quien habitualmente la hierve antes de consumirla (9, 18).

La intensidad del tratamiento térmico necesaria para destruir los microorganismos o sus esporas depende de la especie de microorganismo, de su estado fisiológico y de las condiciones del medio en el momento de efectuar el tratamiento. Según el tratamiento térmico que se emplee, es posible que se destruyan sólo algunas células vegetativas, la mayoría de las células o todas las células, parte de las esporas bacterianas o la totalidad de las mismas. En el caso de la leche, los tratamientos con calor habituales incluyen el proceso de pasteurización, por el cual se eliminan todos los gérmenes patógenos y el proceso de esterilización, el cual al eliminar tanto microorganismos patógenos como toxigénicos, prolonga el vencimiento de la misma, siendo en consecuencia más efectivo que la pasteurización (19, 20, 21).

a. Pasteurización de la leche

En el año 1824, cuarenta años antes de las investigaciones de Pasteur sobre la destrucción térmica de los microorganismos presentes en el vino y en la cerveza, ya se habían realizado propuestas para el tratamiento térmico de la leche. Cuando la industria

láctea implantó la pasteurización de la leche en el año 1890, lo hizo tanto para retrasar el agriado como para evitar la difusión de enfermedades. Hoy en día, más que las consecuencias de la alteración, es la inocuidad la que determina las exigencias legales mínimas de la pasteurización (3).

La pasteurización es un tratamiento térmico que destruye parte de los microorganismos existentes en los alimentos, aunque no todos. El calentamiento se puede llevar a cabo con vapor, con agua caliente, con calor seco o con corrientes eléctricas, enfriándose los alimentos inmediatamente después de haber sido sometidos a tratamiento térmico. La pasteurización es con frecuencia una exigencia legal adoptada como medida de salud pública, debido a la implicación frecuente de algún producto alimenticio como vehículo de enfermedad (3, 18, 19).

La pasteurización se ha clasificado en varias opciones a emplear, esto significa que este proceso se puede utilizar cuando:

- 1) Tratamientos térmicos más intensos podrían perjudicar la calidad del alimento, como es el caso de la leche comercial,
- 2) Su única finalidad es destruir los microorganismos patógenos, como es el caso de la leche comercial,
- 3) Los microorganismos capaces de producir alteraciones no son muy termorresistentes y,
- 4) Por quedar en el alimento cualquier microorganismo vivo capaz de alterarlo, será preciso emplear otros procedimientos de conservación, como es el caso de la refrigeración de la leche comercial (19).

Tanto los tiempos como las temperaturas que se utilizan en la pasteurización, dependen del procedimiento empleado y del alimento a tratar. El sistema de pasteurización denominado temperatura elevada-tiempo corto por sus siglas en inglés HTST (High Temperature-Short Time), es un sistema automatizado que consta de una serie de aditamentos diseñados de tal manera que permite la pasteurización de la leche en

cantidades ilimitadas mediante un flujo constante, a una relación tiempo-temperatura adecuada en todo momento (72 °C durante 15 segundos). Mientras que en el procedimiento denominado temperatura baja-tiempo prolongado ó LTH (Low Temperature Heating) se emplea una temperatura más baja durante un tiempo mayor (62.8 °C durante 30 minutos), ambos procesos van seguidos por un enfriamiento rápido. Muchos microorganismos mueren con la aplicación del proceso de pasteurización, sin embargo, es importante que la leche no se contamine después de terminar el proceso (3, 19, 20, 22).

Una tercera forma para preservar los alimentos se conoce como método de temperatura ultra elevada ó UHT. Las industrias lácteas dedicadas a la “esterilización comercial” de la leche mediante el proceso UHT, emplean una temperatura aproximada de 135 - 150 °C por un período de 2 a 10 segundos. Cabe mencionar, que la leche UHT es un alimento appertizado. El término “appertización”, hace referencia a tratamientos en los que los únicos microorganismos que sobreviven son incapaces de desarrollarse en el interior del producto en condiciones normales. Como consecuencia, los productos appertizados tienen una vida comercial prolongada incluso en el caso de que se almacenen a temperatura ambiente. El término fue utilizado como alternativa a la todavía universalmente utilizada expresión de los productos “comercialmente estériles”, la cual no fue muy aceptada debido a que la esterilidad no es un concepto relativo: un determinado producto, o es estéril o no lo es. Un alimento appertizado o comercialmente estéril no necesariamente es estéril, es decir, totalmente exento de microorganismos viables (3, 12).

Hay que tener en cuenta que con la pasteurización no se puede mejorar la calidad de la leche, solamente conservarla. La ventaja de este método es que suministra una leche pura, sin microorganismos patógenos en general y sin perder su riqueza vitamínica (22).

b. Esterilización

La leche esterilizada es aquella que ha sido sometida a un proceso térmico suficiente para asegurar la ausencia de gérmenes patógenos, toxigénicos o toxinas, con lo cual deberá

mantener su estabilidad y buena calidad comercial durante un período de tiempo suficientemente largo (22).

1) Esterilización de leches envasadas:

- a) **Sistema discontinuo:** consta de autoclaves fijas o móviles donde se ubican las botellas de vidrio, los tratamientos térmicos son largos y a temperaturas altas lo que trae a veces problemas de sabor a cocido u oscurecimiento. Estos sistemas hoy sólo se utilizan en pequeñas industrias (22).
- b) **Sistemas continuos:** son los llamados “torres”. Se basan en tres torres: la del medio tiene vapor a presión y las otras dos actúan como fuerza hidrostática de equilibrio. La leche envasada entra al sistema ya preesterilizada, va descendiendo por la torre y aumentando su temperatura hasta los 100 °C, allí pasa a una segunda torre donde está a 115 °C por 15 minutos, en la tercera torre los envases se van enfriando hasta los 30 °C. La calidad de las leches obtenidas por este método es excelente, aunque al sufrir ebullición algunas vitaminas son destruidas, por lo que generalmente se le adicionan vitaminas A y D (22).

2) Esterilización de leche a granel:

En este caso se tratan las leches por cortos períodos a elevadas temperaturas por medio de equipos UHT. La temperatura de calentamiento es de 135 - 150 °C en un período de 2 a 10 segundos para destruir las lipasas (enzimas) bacterianas. El envasado es aséptico, en recipientes estériles. Los envases deben ser opacos, livianos, impermeables al agua y gases, sin sabor ni olor y resistentes a los pre-tratamientos químicos o térmicos. Los más utilizados son los Tetra Brik (forma de ladrillo) o Tetra Pack (tetraédricos) con un laminado de polietileno, cartón, tinta oscura, aluminio y polietileno para mayor conservación (22).

7. Productos lácteos

La leche de vaca constituye un interesante y complejo sistema coloidal, cuyas propiedades resultan de gran importancia en la elaboración de los llamados productos lácteos. Este término se emplea en la industria alimentaria en relación con una escala muy amplia de productos fabricados a partir de la leche cruda, la cual se procesa para separar los componentes principales, o sea la crema y la leche descremada. O bien, se procesa para convertirla en mantequilla, queso, helados y otros productos lácteos conocidos. Así mismo, la leche puede modificarse mediante la condensación, deshidratación, añadidura de sabores, el fortalecimiento, la desmineralización y por otros tratamientos más (18, 23).

También la leche entera o sus componentes pueden emplearse como tales, o bien se les puede combinar en diversas proporciones para su incorporación a un gran número de productos alimenticios fabricados, entre ellos la leche chocolatada, el pan, los pasteles, artículos de confitería, sopas y muchos otros productos alimenticios que no pertenecen realmente a la categoría de los productos lácteos (3, 23).

8. El sector lácteo en Guatemala

En países en desarrollo como Guatemala, la actividad láctea representa uno de los sectores agropecuarios con mayor impacto socioeconómico, en donde actualmente se producen más de 270 millones de toneladas métricas de leche de vaca fresca por año. Durante años ha representado el medio de vida para muchos productores y sus familias, generando miles de empleos directos en la producción y la industria (24).

Según la Cámara de Productores de Leche de Guatemala, las principales regiones productoras de este alimento en el país son, la región Sur-Oriente (37 %), Nor-Oriente (19 %), Central (16 %) y otras regiones (28 %). De la región Central (departamentos de Guatemala, Sacatepéquez y Chimaltenango) uno de los municipios en donde se produce la mayor cantidad de leche de vaca es San José Pinula (perteneciente al departamento de

Guatemala) con 14,643 litros diarios (Anexo 1). Otro municipio de importancia en el área central es Antigua Guatemala que, aunque no se considera uno de los mayores productores de leche de vaca -747 litros diarios- (Anexo 2), es el que presenta la mayor población de habitantes (59,790) del departamento de Sacatepéquez (Anexo 3) (25-28).

B. Género *Listeria*

1. Características morfológicas, bioquímicas y serológicas

Los miembros del género *Listeria* son bacilos cortos gram positivo no esporulados, con tendencia a presentarse en cadenas cortas de tres a cinco microorganismos. Su morfología celular puede ser cocoide o bacilar y miden de 0.4 a 0.5 μm por 0.5 a 2 μm , presentan de uno a cinco flagelos peritricos que les confieren una movilidad característica en forma de sombrilla cuando crecen a temperaturas de 20 a 25 °C. Son anaerobios facultativos y su crecimiento óptimo es entre 30 y 37 °C. Bioquímicamente, todas las especies del género son catalasa positivo, oxidasa negativo, las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas, hidrolizan la esculina en pocas horas pero no la urea ni la gelatina, no producen indol ni ácido sulfhídrico y producen ácido a partir de glucosa y otros azúcares como ramnosa, xilosa, etc., (3, 4, 29).

El género *Listeria* incluye siete especies que han sido aisladas del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, alimentos frescos y procesados, desechos de los mataderos, así como en el tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos. Las especies aisladas de este género son: *L. murrayi*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. monocytogenes*, siendo ésta última la única implicada en patología humana y *L. ivanovii* que es ocasionalmente responsable por abortos en animales, por lo que las otras especies son no patogénicas (3, 4, 29, 30).

2. Hábitat y condiciones ambientales de crecimiento

L. monocytogenes es una especie que se encuentra de manera generalizada tanto en el medio agrario (suelos, plantas, materia fecal, aguas residuales y agua) como en el ambiente de elaboración de alimentos. Ha sido aislada de varias especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos. No obstante su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual vive y crece como saprofito. Los microorganismos pueden perdurar hasta tres meses en las heces de las ovejas y se ha comprobado que sobreviven once meses y medio en suelos húmedos, hasta 16 meses y medio en heces de bovinos, 207 días sobre paja seca y más de dos años en suelos secos. También se ha comprobado que el ensilaje fermentado inadecuadamente con pH mayor de 5, puede favorecer el crecimiento y supervivencia prolongada de *L. monocytogenes*, considerándose como una fuente importante de infección en vacas, ovejas y cabras, ocasionándoles principalmente encefalitis, abortos espontáneos, nacimientos prematuros y mastitis (4, 31, 32).

Su crecimiento óptimo es entre 30 y 37 °C, aunque puede crecer en un rango de 3 a 45 °C, por lo que es considerado como un patógeno psicotolerante. Es resistente a diferentes condiciones medio ambientales tales como el contenido alto en sal, siendo capaz de crecer hasta en un 10% de cloruro sódico, puede crecer con o sin la presencia de aire, en alimentos con valores de pH entre 4.5 y 9.2 y en actividades de agua (cantidad de agua libre disponible para el crecimiento microbiano y para los procesos químicos y enzimáticos; la actividad de agua de la leche esta estimada en 0.99, la del agua pura es 1.00) por encima de 0.92. Además, como característica particular, presenta una inusual resistencia a los ambientes extremos, ya que es capaz de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en alimentos congelados (resiste temperaturas de – 0.4 °C incluso hasta – 20 °C durante dos años) o secos y tiene la capacidad de resistir a una pasteurización inadecuada (4, 29, 33).

3. Determinantes de patogenicidad

L. monocytogenes es un microorganismo intracelular facultativo que invade y prolifera en una variedad de células de mamíferos, incluidos los macrófagos, las células

epiteliales y los fibroblastos. La capacidad del microorganismo de penetrar en el citoplasma de la célula, proliferar y diseminarse a las células adyacentes es esencial para la expresión plena de su potencial patogénico. La virulencia de la bacteria es multifacética y al parecer se debe tanto a los componentes antifagocíticos que están presentes en la superficie celular del microorganismo, como a los productos solubles excretados durante la proliferación (30, 34).

El producto soluble mejor definido es una hemolisina, la listeriolisina O, que desempeña un papel importante en la patogenia de la infección. Cuando es fagocitado, el microorganismo empieza a fabricar listeriolisina, que se fija al colesterol y rompe la membrana del fagolisosoma lo que conduce a la proliferación descontrolada de los microorganismos dentro del citoplasma del fagocito. Se ha demostrado que esta proteína contribuye a la virulencia de *L. monocytogenes* porque inhibe el procesamiento del antígeno mediado por los macrófagos (4, 30, 32).

Otro factor antifagocítico presente en la pared celular de las listerias es el LPS, el cual presenta propiedades químicas, físicas y biológicas muy parecidas a las de las endotoxinas lipopolisacáridas (LPS) de las bacterias gram negativas. Se cree que el LPS es responsable del síndrome por crioaglutininas transitorio que se observa en algunos pacientes con infecciones septicémicas por listerias. Los anticuerpos inducidos en estos pacientes pueden, en condiciones adecuadas, reaccionar con los propios eritrocitos del huésped y causar una lisis *in vivo* mediada por el complemento (30).

4. Epidemiología

De manera típica *L. monocytogenes* es de incidencia esporádica y su distribución es mundial. Ha sido aislada del suelo, agua, de vegetales en descomposición y ensilajes (fuente principal de infección en los rumiantes), así como también de seres humanos con la enfermedad, de portadores sanos y de un amplio espectro de otros mamíferos, aves, peces, garrapatas y crustáceos. Además, se ha recuperado tras epidemias a partir de lácteos,

carnes y verduras y ha sido considerada como uno de los siete patógenos principales que se encuentran involucrados en las enfermedades transmitidas por alimentos -ETA's-. Hoy en día estas enfermedades son un importante reto para la salud pública, ya que constituyen un peligro para la salud humana. De acuerdo con las últimas estadísticas presentadas por la Organización Mundial de la Salud -OMS-, las ETA's son causantes entre 3.3 a 12.3 millones de casos y alrededor de 3,900 muertes en los Estados Unidos de América (2, 5, 30).

En países como Estados Unidos de América, los datos de una vigilancia activa mostraron unas tasas de infección anual entre 1982 y 1986 de 7.4 casos de listeriosis por millón de habitantes, correspondientes a 1,850 casos anuales con 425 muertes atribuibles por año. La mayoría de estos casos se concentraron en la población menor de un mes y mayor de 60 años. Sin embargo, es preocupante la descripción de brotes alimenticios desde 1983 donde la población general se vio afectada y los cuales se asociaron más frecuentemente con el consumo de quesos blancos y leche cruda. Así mismo, en algunos países de Europa, la incidencia anual de listeriosis fue estimada en un rango de 0.1 a 11.3 casos por millón de habitantes durante 1990 (35, 36, 37).

En años más recientes, la tasa de infección reportada en Estados Unidos fue de 1 a 9 casos de listeriosis por millón de habitantes por año, de los que un tercio sucedieron en embarazadas con el consiguiente riesgo, por vía transplacentaria o por el canal del parto, de sepsis perinatal o muerte fetal. Sin embargo, entre 1996 y el 2001, se observó una disminución en el número de casos, presentándose entre 3 a 5 casos de listeriosis por millón de habitantes por año. El 99 % de los casos de listeriosis son de origen alimentario, el resto obedece a la infección de los neonatos por una madre infectada o por contagio en salas de neonatología. La complicación reside en que entre el 20 y 30 % de los casos de origen alimentario da lugar a defunciones (5, 38).

Cabe mencionar, que en Norte América han ocurrido cinco brotes principales de listeriosis. El primero se dio en Canadá en 1981, el cual implicó a 41 casos en total; de los

34 casos perinatales, hubo 9 partos prematuros, 23 casos en recién nacidos con una tasa de mortalidad del 27 % y 2 nacimientos vivos de niños sanos. La tasa de mortalidad en los adultos fue del 28.6 %. El alimento implicado en el brote fue una ensalada de repollo, la cual había sido cultivada en campos que habían sido abonados con estiércol reciente de ovejas con listeriosis. Durante el verano de 1983, la leche pasteurizada fue responsable de un brote en Massachussets que implicó a 42 adultos y a 7 casos perinatales. De las 49 personas involucradas en el brote, catorce murieron dando una tasa de mortalidad global del 29 %. La leche implicada en el brote había llegado de granjas en las que había existido listeriosis bovina (3, 31).

En junio de 1985, *L. monocytogenes* emergió como un serio patógeno asociado a las enfermedades transmitidas por alimentos, cuando el consumo de un queso estilo mexicano fue el responsable de cerca de 300 casos de listeriosis, incluyendo 85 muertes entre hispanos en el sureste de California. Un total de 142 casos involucraron a 93 mujeres embarazadas y a 49 adultos inmunocomprometidos (exceptuando mujeres embarazadas) en el condado de Los Ángeles. Cuarenta y ocho de estos individuos murieron, dando una tasa de mortalidad del 33.8 %. Inspecciones subsecuentes realizadas a la fábrica, indicaron que el queso implicado en el brote había sido ilegalmente fabricado con una combinación de leche cruda y leche pasteurizada (39).

En julio de 1994, se reportó el cuarto brote en el que 54 de 60 (90 %) personas, desarrollaron listeriosis entre 9 a 32 horas luego de haber consumido leche chocolatada pasteurizada en un picnic en Illinois. Asimismo, se registraron 12 casos adicionales en Illinois, Wisconsin y Michigan. En este brote, los síntomas gastrointestinales (diarrea, fiebre, escalofríos, náuseas y vómitos) fueron los que predominaron. Adicionalmente, sólo cuatro personas requirieron hospitalización, incluyendo una mujer embarazada que dio a luz a un bebé sano, 5 días después de haber tenido diarrea por casi 6 horas. Probablemente, los factores que contribuyeron al desarrollo de *L. monocytogenes* en la leche chocolatada fueron, la contaminación post-pasteurización de la leche y la inadecuada y/o no existente refrigeración durante el envasado y transporte de la misma (40).

Durante agosto de 1998 a febrero de 1999, el consumo de hot dog fue asociado con el segundo brote de listeriosis más grande ocurrido en los Estados Unidos de América, en el cual se reportaron 108 casos en 24 estados. Más del 80 % de las víctimas eran adultos con una edad media de 70 años y más del 60 % de éstos padecía de alguna enfermedad subyacente. Este brote provocó 14 muertes y 4 abortos espontáneos, dando una tasa de mortalidad del 17 % (41).

Diversas investigaciones sobre *L. monocytogenes* se han llevado a cabo en otros países, entre las que se menciona, una realizada en Canadá durante 1988, en la cual se determinó una incidencia general del 12.4 % de especies de *Listeria* en 445 muestras de leche cruda analizadas. *L. innocua* fue la más frecuentemente aislada en un 9.7 % (43 muestras), mientras que *L. monocytogenes* y *L. welshimeri* fueron encontradas cada una en un 1.3 % (6 muestras) de las muestras de leche. No se encontraron otras especies de *Listeria* (42).

Otra investigación similar se llevó a cabo en Brasil, en una planta de productos lácteos, durante los meses de octubre de 1989 a septiembre de 1990 (excepto diciembre). Esta investigación evaluó la presencia de *Listeria* spp en un total de 440 muestras de leche (220 muestras de leche cruda y 220 muestras de leche pasteurizada). En general, se determinó que el 12.7 % (28) de las muestras de leche cruda, el 0.9 % (2) de muestras de leche pasteurizada y el 6.8 % (30) del total de muestras de leche estaban positivas para *Listeria* spp, mientras que el 9.5 % (21) de muestras de leche cruda, ninguna de las muestras de leche pasteurizada y el 4.8 % (21) del total de muestras de leche estaban positivas para *L. monocytogenes*. La leche cruda también contenía *L. innocua* en un 9.5 %, *L. welshimeri* en un 0.9 % y *L. grayi* en un 0.4 %. La leche pasteurizada solamente contenía *L. innocua* (0.9 %) (43).

En Francia en 1992, Goulet *et al.*, realizó un estudio en el que recolectó información de 225 casos de infecciones causadas por *L. monocytogenes*, excluyendo a aquellas que estuvieran relacionadas con mujeres embarazadas. En este caso, los más afectados fueron

los del sexo masculino (62 %) y las personas mayores a los 65 años de edad. El 81 % del total de casos, ocurrieron en personas con alguna condición subyacente: el 34 % de ellos eran pacientes con severa inmunosupresión, el 37 % estaban con diálisis o tenían diabetes mellitus, alcoholismo, falla hepática, entre otros y el 10 % restante presentaban alguna otra condición subyacente que no estaba asociada a la inmunosupresión. Las formas clínicas que se presentaron con mayor frecuencia fueron: la infección del sistema nervioso central en adultos previamente sanos (80 %) y el desarrollo de bacteriemia (52 %). La tasa de mortalidad fue del 24 % (44).

En la Fundación –Clínica Valle del Lili- en Cali, Colombia, se ha visto desde 1994 la aparición cada vez más frecuente de listeriosis en pacientes inmunosuprimidos y en neonatos. De un total de 19 casos confirmados bacteriológicamente, 10 se presentaron en adultos inmunosuprimidos, 2 en mujeres embarazadas, 6 en neonatos y una adolescente, la mayoría con septicemia. Del total de casos, 5 murieron a causa de listeriosis. El hecho de que varios pacientes refirieron el consumo de alimentos crudos, particularmente quesos, leche cruda no pasteurizada, legumbres sin cocinar, indica que posiblemente esta fue la vía de infección (35).

En ese mismo año, se llevaron a cabo dos estudios en Colombia, uno en la zona cundiboyancense donde se recuperó *L. monocytogenes* en un 34 % de las leches crudas y en un 2 % de las leches pasteurizadas. Otro realizado en Antioquia, en donde se determinó una prevalencia *L. monocytogenes* en el 33.1 % de 172 muestras de quesos blancos procesadas. El nivel de contaminación reportado por estos estudios es considerablemente mayor al encontrado en otros países tales como Holanda (4.4 %), Francia (4.6 %) o Estados Unidos (12 %) con prevalencias entre el 5 % y 12 % en lácteos y en Brasil del 10.7 % en quesos (35).

En 1997, se llevaron a cabo dos investigaciones en la ciudad de Guatemala. En una se determinó la presencia de *L. monocytogenes* en el 3 % de 100 muestras de camarón de exportación y consumo local procesadas y en la otra se determinó una prevalencia del 5.49

% en 91 muestras de quesos (subtipos cacciocavallo, fresco, ricota y de capas) de producción comercial (6, 7).

En Turquía durante 1998, se efectuó un análisis para determinar la presencia de *Listeria* spp en 100 muestras de leche cruda de diferentes regiones de Anatolia y 20 muestras de leche pasteurizada de 3 diferentes fábricas en Ankara. La incidencia general de *Listeria* spp fue del 10 % en leche cruda y el 5 % de leche pasteurizada. *L. monocytogenes* fue encontrada en el 1 % (1/100) de las muestras de leche cruda y en el 5 % (1/20) de las muestras de leche pasteurizada. *L. innocua* y *L. seeligeri* fueron determinadas en un 8 % y 2 % de las muestras de leche cruda, respectivamente. En este análisis no se encontraron otras especies de *Listeria* (45).

En una investigación realizada en el año 2001, se determinó la incidencia de *Listeria* sp en dos plantas de procesamiento de leche al noreste de Irlanda. Los sitios de muestreo incluyeron el ambiente donde se procesaba la leche (paredes, pisos, drenajes, etc.), el equipo de procesamiento, muestras de leche cruda y pasteurizada. La incidencia general de *Listeria* sp en el equipo fue de 18.8 % (6.3 % *L. monocytogenes*), en el ambiente fue de 54.7 % (40.6 % *L. monocytogenes*) y en la leche cruda fue de 44.4 % (22.2 % *L. monocytogenes*). Sólo en una ocasión, se aisló *L. welshimeri* en la leche pasteurizada, esto debido a una contaminación post-pasteurización del producto (46).

En el 2002, los Centros de Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos –CDC-, reportaron varios brotes producidos por *L. monocytogenes*. En esta ocasión, hubo 46 casos confirmados que fueron ligados al consumo de carne de pavo. Los casos se presentaron en Pennsylvania -14-, New York -18-, New Jersey -5-, Delaware -4-, Maryland -2-, Connecticut -1-, Massachusetts -1- y Michigan -1-, con un total de 10 muertes que corresponden a una tasa de mortalidad del 22 % (7 adultos y 3 abortos espontáneos) (47).

En el 2003, se realizó un estudio en Costa Rica, en el cual se determinó la presencia de *L. monocytogenes* en el 3 % de 100 muestras de leche cruda evaluada. Este porcentaje concuerda con otros resultados reportados en la literatura, donde la prevalencia de la bacteria en leche cruda oscila entre 0 % en Italia y Nueva Zelanda y un 5.4 % en Canadá, encontrándose una prevalencia mundial del alrededor del 2.2 %. Es importante destacar que esta bacteria se aisló a partir de muestras destinadas a uso industrial así como de productores independientes. En ese mismo año se realizó otra investigación en Perú, en donde se determinó la presencia de *L. monocytogenes* en el 4.05 % de 74 muestras de queso fresco de producción artesanal (2, 48).

5. Asociación con alimentos

L. monocytogenes puede transmitirse a los humanos a través de la ingestión de alimentos contaminados con la bacteria. Su amplia distribución en el ambiente y su capacidad para crecer en la superficie de la mayoría de alimentos, ofrece a *L. monocytogenes* oportunidades abundantes para introducirse en los distintos pasos de la producción alimentaria, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección. *L. monocytogenes* ha sido aislada en una amplia variedad de alimentos frescos y procesados como leche líquida cruda y pasteurizada, leche en polvo, quesos (en especial las variedades suaves y curadas), helados, verduras y legumbres crudas, productos cárnicos especialmente productos de carne cruda o derivados sin cocinar, las aves y sus productos, pescados y mariscos. Se ha demostrado también que el microorganismo puede sobrevivir el procesamiento de quesos (Cheddar, Camembert, Cotagge) y durante el proceso de secado por spray en la producción de leche descremada en polvo (3, 4, 29, 33, 49).

Es importante mencionar que dentro de los análisis alimentarios de rutina no se realiza la búsqueda de *L. monocytogenes* y específicamente en alimentos considerados a riesgo como es el caso de los lácteos: leche y quesos. De rutina tampoco se identifica a *L. monocytogenes* en cultivos de materia fecal, por lo que es posible que no se identifiquen

muchos de los brotes entéricos. Al encontrar a tiempo estos brotes se determinan los alimentos contaminados y se evita así una mayor diseminación de la enfermedad (35).

a. Origen de la contaminación de la leche cruda y productos lácteos por *L. monocytogenes*

La leche y productos lácteos son quizás los alimentos en los que más se ha centrado la investigación sobre la contaminación por *L. monocytogenes*, debido a la relación de estos productos con los brotes de listeriosis ocurridos en Estados Unidos de América y otros países en años anteriores (50).

Se ha postulado una ruta potencial de transmisión de *L. monocytogenes* desde las fincas lecheras al hombre. Ciertos estudios se han llevado a cabo para determinar el origen de la contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes* en las granjas lecheras. Según estos estudios, las fuentes más importantes de contaminación por *L. monocytogenes* la constituyen los enfermos y portadores sanos que van diseminándola en el ambiente a través de la orina, las heces y otras secreciones, así como también, el medio ambiente y los alimentos que se le proporcionan al ganado (heno, concentrado y ensilaje). Así, en el caso de mastitis causadas por esta bacteria en el ganado bovino, ovino y caprino, el microorganismo es excretado en la leche de los animales afectados hasta tres meses después de la desaparición de los síntomas clínicos, lo que hace que esta leche sea un peligro potencial para el consumidor si no se le aplica el tratamiento térmico adecuado. *L. monocytogenes* es un microorganismo ubicuo por lo que su presencia, por ejemplo, en el ambiente de los establos, los utensilios de ordeño e incluso los operarios, puede ocasionar la contaminación de la leche cruda (50, 51, 52, 53).

En Francia en 1993, Sanaa *et al*, determinó que los siguientes factores de riesgo: la mala calidad del ensilaje (pH > 4.0), la inadecuada frecuencia de limpieza del área de ordeño, la limpieza deficiente de las vacas (ubres y pezones), la iluminación insuficiente de las salas de ordeño y los establos y la incorrecta desinfección de las toallas con que secan la

ubre y pezones de las vacas entre cada ordeño, estaban significativamente asociados con la contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes* (54).

6. Patogenia y manifestaciones clínicas

L. monocytogenes es un microorganismo patógeno intracelular facultativo que de igual modo que *Mycobacterium* sp, *Brucella* sp y otros, es capaz de sobrevivir y multiplicarse en las células del sistema monocítico-macrófago. La bacteria se une a las células intestinales e induce su endocitosis; ambos procesos se ven favorecidos por el factor de virulencia p60, una proteína de 60 kDa. Las condiciones presentes en el interior del fagolisosoma (pH bajo y baja concentración de hierro) hacen que el microorganismo empiece a producir la listeriolisina O, que se fija al colesterol y rompe la membrana del fagolisosoma favoreciendo la multiplicación intracelular dentro del citoplasma del fagocito. Este puede ser el principal factor que favorece su supervivencia intracelular, siendo una de las características patogénicas de *L. monocytogenes*. La curación es consecuencia de la inactivación de la bacteria por macrófagos activados por las células T que han sido sensibilizadas (3, 4).

Teniendo en cuenta la amplia distribución de este microorganismo en el medio, la existencia de portadores asintomáticos y la escala de incidencia de infecciones, habitualmente de carácter oportunista, cabe imaginar que los mecanismos de defensa frente a *L. monocytogenes* son verdaderamente eficaces. En efecto, el desarrollo y la gravedad de la infección dependen de la dosis infectante, ciertos determinantes de virulencia bacteriana y fundamentalmente de la susceptibilidad del hospedero dependiente sobre todo de la inmunidad celular. La disfunción en algún punto del eje esencial de la inmunidad celular - células CD4 +, citocinas, macrófagos, etc.-, convierte al paciente en vulnerable frente a la invasión y lesión tisular por *L. monocytogenes*. La proporción de fatalidad por listeriosis es mayor (38 – 45 %) en individuos altamente susceptibles, como personas inmunosuprimidas, incluyendo mujeres embarazadas, recién nacidos, niños y ancianos (29, 30, 33).

Los síntomas de la enfermedad pueden variar desde los correspondientes a una enfermedad benigna parecida a la influenza, con fiebre, dolor de cabeza y, accidentalmente, síntomas gastrointestinales. En el caso de listeriosis no invasiva, los síntomas están más asociados con el sistema digestivo (diarrea, dolor abdominal náuseas, vómitos, calambres, etc.). Sin embargo, debido a que *L. monocytogenes* muestra sorprendente tropismo por el feto y la placenta, puede haber una infección transplacentaria asociada del feto que puede provocar aborto o nacimientos prematuros. La mujer embarazada sufre listeriosis leve preferentemente en el tercer trimestre, con manifestaciones seudogripales, gastrointestinales y en ocasiones, bacteriémicas. El período de incubación de la enfermedad puede variar desde uno hasta 90 días, con un período típico de 3 a 4 semanas (3, 30, 37).

La listeriosis en el recién nacido puede constituir un síndrome de aparición precoz, que se presenta en el momento del nacimiento o poco después, o una enfermedad de aparición tardía que se manifiesta desde varios días a varias semanas después del nacimiento. La enfermedad de aparición precoz es consecuencia de una infección en el útero, posiblemente por aspiración de líquido amniótico infectado, y se caracteriza por neumonía, diarrea, convulsiones, septicemia y granulomas (abscesos) muy diseminados. Esta forma de la enfermedad tiene una tasa de mortalidad muy elevada (del 54 al 90 %), que se debe en gran parte al hecho de no haber considerado el diagnóstico en las primeras etapas. El síndrome de aparición tardía aparece al quinto día de vida con una meningitis habitual (3, 4, 30).

En el adulto las principales infecciones son meningitis (55 %), bacteremia primaria (25 %), endocarditis (7 %) e infecciones no meningíticas del sistema nervioso central (6 %). Las enfermedades malignas o la inmunosupresión (alcoholismo, cirrosis hepática, diabetes o vasculitis, receptores de transplantes, pacientes con cáncer, SIDA, etc.) son con frecuencia factores predisponentes. La tasa de mortalidad global entre los pacientes con meningitis es del 30 %, pero en los pacientes con cáncer y con meningitis por *L. monocytogenes* la tasa de mortalidad es del 60 %. Es esencial el tratamiento precoz con antibióticos (3, 30).

7. Tratamiento

El antibiótico más empleado ha sido la ampicilina en elevadas dosis (200-300 mg/kg/día, por vía intravenosa y repartida en 4 dosis) asociada o no a aminoglucósidos durante 2-4 semanas, de acuerdo con la gravedad del trastorno. La penicilina G (300.000 UI/kg/día por vía intravenosa en 6 dosis) es probablemente similar en cuanto a eficacia. En pacientes alérgicos se recomienda el empleo de trimetoprim-sulfametoxazol o eritromicina. Las cefalosporinas no deben utilizarse, puesto que son ineficaces *in vitro* y por su limitada penetración en las meninges; además, se han descrito fracasos terapéuticos con su empleo. En los pacientes de alto riesgo, como los neonatos y sujetos inmunosuprimidos, se recomienda como terapéutica inicial la penicilina o la ampicilina y un aminoglucósido (4, 5, 30).

8. Prevención clínica

No existe una vacuna para la prevención de la listeriosis. El control efectivo de las infecciones por *L. monocytogenes* se ve impedido por las dificultades para reconocer la infección en el hombre y en los animales. En el recién nacido la listeriosis puede prevenirse mediante el reconocimiento temprano y el pronto tratamiento de la madre. La prevención debe basarse en la eliminación de los reservorios animales y en evitar el contacto con animales o con productos animales infectados (30).

9. Identificación de riesgos microbiológicos

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación -FAO- y la Organización Mundial de la Salud -OMS-, el efecto de la exposición de la *L. monocytogenes* depende de los factores predisuestos, tales como la edad y el estado inmunológico. El tamaño de la población que tiene tales factores predisuestos puede diferir de región a región. Además, las condiciones durante la

distribución, almacenamiento y la venta pueden ser distintas; como consecuencia, las estimaciones de riesgo pueden variar (33).

La evaluación de riesgos para *L. monocytogenes* ha demostrado que en relación con la probabilidad de enfermedad, hay una diferencia cuando se consumen los alimentos con niveles de la bacteria extendiéndose de 0 a 1000/g. Como tal, pueden establecerse medidas de control con la base de un nivel máximo presupuesto de esta bacteria en los alimentos al momento del consumo, lo cual puede guiar la selección de las medidas de control más eficientes, asegurando que no se supere ese nivel (33).

El nivel de *L. monocytogenes* tolerado en los países es muy variable y va de tolerancia 0 en 25 gramos en Estados Unidos hasta permitir la presencia de 100 UFC/g en algunos países de la Unión Europea. En Guatemala, la tolerancia es cero para los productos que requieren la determinación de *L. monocytogenes*. En Mayo de 2004, numerosas asociaciones de industrias de los Estados Unidos presentaron una petición a la Organización de Alimentos y Medicamentos -FDA-, para elevar hasta 100 UFC/g la tolerancia de *L. monocytogenes* en alimentos que no permiten el desarrollo (38, 55).

De acuerdo con los “Principios para el Establecimiento y la Aplicación de Criterios Microbiológicos para los Alimentos” del Codex Alimentarius, una concentración de *L. monocytogenes* que no exceda los 100 por gramo de comida en el momento del consumo se considera de bajo riesgo para los consumidores. A pesar de ello, en el caso de alimentos específicamente dirigidos al consumo de grupos vulnerables de clara identificación (grupos de alto riesgo) como por ejemplo alimentos geriátricos, infantiles, entéricos, se debería conseguir la ausencia total de bacterias en 25 gramos en un cierto número de muestras (33).

La gestión para prevenir el riesgo de contaminación y/o introducción de *L. monocytogenes* debería comenzar en el nivel primario de producción, es decir, en la introducción de medidas para reducir los niveles de la bacteria en tipos específicos de

producción primaria y en tomar medidas de higiene específicas relacionadas con el manejo de los productos. Por eso, las autoridades sanitarias y la industria deben basar el control de *L. monocytogenes* en la debida aplicación y verificación de las Buenas Prácticas de Higiene -BPH- y el Análisis de los Riesgos y Puntos críticos de Control –HACCP-. Además, se debe mejorar la comunicación de riesgos, en particular para los consumidores que presentan mayor riesgo de contraer listeriosis (33).

Algunos enfoques generales para gestionar los riesgos de *L. monocytogenes* en productos lácteos incluyen: la prevención de la contaminación e introducción de la bacteria en la planta de producción; inactivación de la bacteria por medio de la aplicación de procesos de pasteurización, esterilización, cocción y alta presión; establecimiento de requisitos reglamentarios y/o creación de incentivos para cambios de actitud que contribuyan a la reducción de riesgos, por ejemplo, mediante HACCP (33).

10. Programas de prevención industrial

Se deben llevar a cabo programas de información para educar a los consumidores sobre riesgos potenciales y sobre cómo evitar la listeriosis en los alimentos. Tales programas pueden estar dirigidos a informar grupos afectados, sobre las maneras de evitar alimentos que se consideren de alto riesgo y a educar a la población sobre la base de la higiene de los alimentos. Además se pueden incluir capacitaciones sobre la observación de las condiciones de conservación indicadas en el etiquetado, en particular para las temperaturas de conservación bajo refrigeración, observación de la fecha de caducidad, gestión apropiada de la comida que sobra y reglas para la manipulación de los alimentos, entre otras (33).

11. Métodos de Análisis e Identificación de *L. monocytogenes*

En los últimos años se han desarrollado distintos métodos para el análisis e identificación de *L. monocytogenes* en alimentos y muestras ambientales, pero en la

actualidad son tres los que están siendo utilizados. El primero y menos utilizado de éstos es la siembra directa de la suspensión del alimento en un medio sólido selectivo. Una de las ventajas que ofrece esta técnica, es que permite cuantificar directamente la población bacteriana presente en el alimento, pero tiene la desventaja de que sólo puede detectar una cantidad mayor o igual a 100 bacterias por gramo. Para la detección de cantidades menores de la bacteria, se tienen que utilizar procesos de enriquecimiento. El segundo y el más popular de los métodos utiliza uno ó más pasos de enriquecimiento seguido por la siembra en un agar selectivo y es ésta la base de los métodos de aislamiento desarrollados por la FDA y el USDA-FSIS (United States Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service). Los más comúnmente utilizados en los Estados Unidos son, el método de la FDA, que se utiliza para evaluar leche y productos lácteos (particularmente helados y queso), mariscos y vegetales y el método USDA, que se utiliza para evaluar productos cárnicos y muestras ambientales. El tercer grupo de métodos incluye procesos rápidos que van más allá de los métodos tradicionales, a través de la incorporación de técnicas genéticas e inmunológicas que reducen el tiempo de identificación. Casi todos los métodos desarrollados, utilizan una o las dos diferentes características que presenta la bacteria: la habilidad de crecer a temperaturas de refrigeración y la resistencia mostrada hacia varios antibióticos. Básicamente, todos constan de tres pasos principales: enriquecimiento, aislamiento e identificación, los cuales se mencionan con más detalle en los incisos posteriores (4, 6, 29, 31, 56, 57).

- a. **Enriquecimiento:** este paso se realiza porque la mayoría de alimentos que contienen células dañadas de *Listeria* spp por algún tipo de tratamiento y que además contienen una elevada población de contaminantes, necesitan un pre-enriquecimiento para permitir que esas células dañadas se recuperen. Para ello se utilizan medios que contengan un elevado contenido de sustancias nutritivas y que junto a su capacidad tampón se pueda crear las condiciones óptimas para su crecimiento. Dicha bacteria se puede cultivar en caldos enriquecidos tamponados y que contengan acriflavina, ácido nalidíxico y ciclohexamida como agentes

selectivos. El proceso de enriquecimiento ha mostrado que puede recuperar un inóculo menor de 10 UFC/ml a partir de leche cruda (6, 29, 56).

- b. Aislamiento:** después de 24 a 48 horas de incubación a 30 °C, se transfiere una asada del cultivo enriquecido a un medio de cultivo sólido selectivo del género *Listeria*. Entre los medios de cultivo se menciona el agar Oxford, el agar PALCAM, el medio cloruro de litio feniletanol-moxolactam (LMP), etc. Estos medios generalmente contienen polimixina B, ceftacidima, esculina, citrato de amonio férrico, ácido nalidíxico, cloruro de litio y clorhidrato de acriflavina (los tres últimos compuestos, inhiben en gran medida el crecimiento de microorganismos acompañantes). Las cajas de agar Oxford o Palcam se incuban a 35 °C por 24 a 48 horas y el medio LMP se incuba a 30 °C por 24 a 48 horas. En los medios de cultivo Oxford y PALCAM, las colonias de *Listeria* spp pueden ser diferenciadas con relativa facilidad del resto de los microorganismos acompañantes debido al oscurecimiento del medio que se produce alrededor de las colonias al hidrolizar la esculina en presencia de citrato amónico férrico, mientras que las colonias que se desarrollan en el medio LMP sin esculina aparecen verdes azuladas bajo la luz oblicua. Para la identificación del género y especie, se transfieren 5 ó más colonias típicas a placas de agar tripticasa soya con 0.6 % de extracto de levadura (TSAYE = Tryptic Soy Agar Yeast Extract) y se estría para aislar, luego se incuban a 30 °C por 24 a 48 horas (29, 50, 56, 58, 59).
- c. Identificación del género:** la identificación se basa en una serie de pruebas que se realizan a partir de colonias sospechosas aisladas en TSAYE. Al efectuar una tinción de Gram se observarán bacilos cortos gram positivo. Todas las especies del género *Listeria* son catalasa positivo, oxidasa negativo, producen ácido a partir de glucosa y otros azúcares; hidrolizan la esculina, pero no la urea ni la gelatina; dan positivo a las reacciones de Voges-Proskauer y rojo de metilo, no producen indol y son móviles con crecimiento en forma de sombrilla cuando se incuban por siete días a temperatura ambiente (Anexo 4) (4, 29, 56).

- d. Identificación de la especie:** se realiza mediante reacciones bioquímicas y la capacidad de producción de hemólisis. Sólo tres especies son hemolíticas, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*; las dos primeras producen una estrecha zona de hemólisis, a veces limitada al diámetro de la colonia, mientras que *L. ivanovii* muestra una hemólisis amplia. La prueba de Christie, Atkins, Munich-Petersen -CAMP- es positiva para *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* en la proximidad de una estría de *Staphylococcus aureus*. En cuanto a la producción de ácido a partir de carbohidratos, *L. monocytogenes* presenta un perfil xilosa negativo, ramnosa positivo y manitol negativo que la distingue de las otras especies hemolíticas (Anexo 5) (4, 29, 56).

Pueden utilizarse pruebas alternativas como la aglutinación con antisueros (DIFCO), pruebas rápidas comerciales como el API *L. monocytogenes* (bioMérieux, Francia), MicroScan (Dade-Behring) y el Vitek (Vitek Systems). También está disponible una sonda de DNA para la identificación rápida de *L. monocytogenes* a partir de colonias cuyo revelado se basa en una técnica de quimioluminiscencia (4, 28).

- e. Técnicas de Tipificación:** mediante estas técnicas se consiguen diferenciar distintos subtipos dentro de la misma especie. Se aplican en estudios taxonómicos y sobre todo en estudios epidemiológicos (localización del origen de los brotes epidémicos). Entre las técnicas fenotípicas se utilizan la serotipificación, la tipificación por fagos y la electroforesis enzimática. Por la serotipificación se ha llegado a la conclusión de que la mayoría de la patología en humanos es producida por los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b. Entre las técnicas genotípicas se encuentran el perfil de ADN total cortado con enzimas de restricción, la ribotipia, la electroforesis en campo pulsátil y la Reacción en Cadena de Polimerasa ó PCR (4).

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente, *L. monocytogenes* ha sido reconocida como un patógeno importante, que se encuentra asociado a las enfermedades transmitidas por alimentos como la leche cruda, ya que puede ocasionar graves daños a la salud especialmente de mujeres embarazadas, niños, ancianos y personas inmunosuprimidas. La complicación reside en que a pesar de que la incidencia es muy baja, la tasa de mortalidad que produce la bacteria en pacientes afectados es bastante elevada (20 - 30 %) (5).

Debido a que en Guatemala, no se realiza la identificación de *L. monocytogenes* en cultivos de materia fecal, es posible que no se identifiquen muchos de los brotes entéricos. Asimismo, tampoco se determina durante el embarazo y es probable que muchos casos de abortos espontáneos, que se presentan en diferentes instituciones de salud, sean causados por esta bacteria. Además, no se tiene un conocimiento claro de la situación epidemiológica de este agente patógeno y sus posibles consecuencias en la población.

Cabe mencionar que durante muchos años, la industria de lácteos ha representado un medio de vida para muchos productores guatemaltecos, quienes se dedican básicamente a la comercialización de leche cruda como fuente principal de ingresos. Sin embargo, la mayoría de productores no realiza ningún tipo de control de calidad microbiológico ni aplica ningún proceso de pasteurización antes de comercializar la leche, lo que representa un riesgo potencial para la población consumidora.

Debido a la importancia actual de esta bacteria en salud pública y al limitado número de investigaciones en torno a ella, se consideró necesario evaluar la presencia de este patógeno en la leche cruda que se comercializa sin pasteurizar en San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Unidad de Comercialización de la escuela de Zootecnia, con el propósito de establecer si este producto era una posible fuente de *L. monocytogenes* y en base a ello, alertar a los productores de la misma y así prevenir el desarrollo de listeriosis en personas a riesgo.

V. OBJETIVOS

A. GENERAL

Determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda no pasteurizada que se comercializa en localidades de San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

B. ESPECIFICOS

1. Evaluar el estado actual de la leche cruda de vaca que se comercializa en localidades de San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala, a través de la determinación microbiológica de *L. monocytogenes*, para establecer si la leche cruda es un posible vehículo de transmisión de la bacteria y que pueda representar un riesgo potencial para la población consumidora.
2. Reportar la frecuencia de *L. monocytogenes* en muestras de leche cruda de las localidades evaluadas, a las lecherías y centros de acopio respectivos, así como al Departamento de Control de Alimentos y Medicamentos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, para que tomen las medidas necesarias y minimizar los posibles riesgos asociados a la transmisión de dicha bacteria.

VI. HIPÓTESIS

Debido a que la investigación efectuada era de carácter descriptivo, no fue necesario formular hipótesis.

VII. MATERIALES Y METODOS

A. Universo de trabajo

1. **Población:** Centros de acopio o lecherías que comercializan leche cruda de vaca sin pasteurizar en los municipios de San José Pinula (Departamento de Guatemala), Antigua Guatemala (Departamento de Sacatepéquez) y en la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC).
2. **Muestra:** Estuvo constituida por 75 muestras de leche cruda de vaca que se distribuyeron de la siguiente manera: se incluyó de forma intencional a 5 proveedores de leche de cada localidad, donde se recolectaron 5 muestras (volumen mínimo: 100 mililitros por muestra) por cada proveedor, haciendo un total de 25 muestras provenientes de San José Pinula y 25 muestras provenientes de Antigua Guatemala. En la Unidad de Comercialización, se incluyeron a dos proveedores recolectando 11 y 14 muestras respectivamente, haciendo un total de 25 muestras.

B. Recursos

1. Recursos humanos

- a. Asesora de Tesis: Licenciada Brenda López de Quevedo
- b. Tesista: Br. Anabella González Juárez

2. Recursos institucionales

- a. Laboratorio de Control Microbiológico de Alimentos: Unidad de Salud, Universidad de San Carlos de Guatemala. Departamento de Bienestar Estudiantil Universitario.

C. Material y Equipo

1. Equipo

- Cabina de Bioseguridad, nivel II
- Autoclave
- Estufa
- Mechero
- Incubadoras a 30 °C, 35 °C y 37 °C
- Balanza con capacidad máxima de 1,200 gramos
- Baño de María
- Pipeta automática de volumen variable de 100-1000 microlitros (μ l)
- Refrigeradora
- Termómetros
- Microscopio
- Estereoscopio
- Reloj ó cronómetro
- Cámara de Québec

2. Material

- Gradillas de metal
- Espátulas
- Tips o puntas para pipeta estériles
- Aceite de inmersión
- Asas bacteriológicas: en argolla y en hilo
- Bolsas plásticas estériles de 200 ml de capacidad
- Pichel de plástico o acero inoxidable estéril (de preferencia graduado)
- Cinta testigo
- Marcadores indelebles

- Guantes desechables
- Mascarillas desechables
- Papel kraft
- Masking tape
- Fósforos
- Hielo
- Hielera grande

3. Cristalería

- Cajas de Petri estériles de 15 x 100 mm, plásticas o de vidrio.
- Tubos de ensayo con tapón de rosca
- Erlenmeyers de 500 ml
- Erlenmeyer de 1,000 ml
- Probetas
- Pipetas estériles de 1 ml y 10 ml
- Pipetas Pasteur estériles
- Láminas portaobjetos

4. Reactivos

- Peróxido de hidrógeno al 3 %
- Reactivos para la determinación de nitritos
- Zinc en polvo
- Manitol
- Xilosa
- Ramnosa
- Etanol al 95 %
- Colorantes para tinción de Gram (cristal violeta, lugol, alcohol-acetona y safranina)

5. Medios de cultivo

- Caldo de Enriquecimiento *Listeria* (*Listeria* Enrichment Broth –LEB-)
- Agar Tripticasa Soya
- Peptona
- Agar sangre de carnero al 5 %
- Extracto de Levadura
- Agar Oxford base
- Suplementos para agar Oxford
- Caldo base púrpura para fermentación de carbohidratos
- Caldo para reducción de nitratos
- Medio SIM

6. Cepas control

- Cepa ATCC 19115 (American Type Culture Collection) de *L. monocytogenes*
- Cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus*
- Cepa ATCC 6939 de *Rhodococcus equi*.

D. Metodología

1. Ubicación de proveedores

- a. Se realizó una visita a la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y se solicitó la debida autorización para llevar a cabo la investigación, a la cual accedieron posteriormente.

- b. Se realizó un monitoreo para ubicar a los proveedores de los municipios de San José Pinula y Antigua Guatemala. Para agilizar su ubicación, se acudió a la Municipalidad de San José Pinula y al Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación (MAGA) con sede en Antigua Guatemala. A cada proveedor se le explicó en que consistía el estudio y también se solicitó la autorización para realizar la investigación.
- c. A los que participaron en el estudio, se les informó que los resultados les serían notificados por escrito al finalizar el mismo. El nombre de cada finca y centro de acopio fue codificado por letras mayúsculas y ordenado cronológicamente de acuerdo a la fecha de muestreo.

2. Procedimientos

a. Primera Fase: Estandarización de las técnicas

Para fines de la investigación, se estandarizaron las técnicas y se verificaron las reacciones de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento e identificación de la bacteria con la cepa ATCC 19115 de *L. monocytogenes*. Para verificar si la metodología planteada podía detectar e identificar satisfactoriamente cantidades mínimas de la bacteria, se realizó una inoculación experimental de muestras de leche pasteurizada con suspensiones que contenían una concentración conocida de *L. monocytogenes*, para luego realizar todas las pruebas de aislamiento e identificación de la misma, según la metodología descrita en Cano *et al.* (1995).

1) Preparación de las suspensiones del inóculo de *L. monocytogenes*

- Se inoculó la cepa ATCC 19115 de *L. monocytogenes* en 10 ml de caldo tripticasa soya. Se incubó 24 horas a 37 °C (cultivo inicial).

- Para preparar cultivos frescos, se inocularon alícuotas de 0.1 ml del cultivo inicial en 10 ml de caldo tripticasa soya. Se incubaron dichas alícuotas durante 4 horas a 37 °C.
- Se prepararon diluciones decimales desde la dilución 1:5 hasta la 1:100,000 a partir de las alícuotas anteriores, utilizando agua peptonada. Se sembraron cuatro placas por cada dilución en agar tripticasa soya con 0.6 % de extracto de levadura (TSAYE), utilizando el método de vertido en placa. Se incubaron 48 horas a 37 °C.
- Se efectuó la estimación del número de células viables presente en cada dilución por medio de un conteo directo en la superficie de cada placa asumiendo que cada colonia representaba una unidad viable, o sea una Unidad Formadora de Colonia (UFC). La carga microbiana presente en cada dilución correspondió a la concentración aproximada de cada una de las suspensiones que se prepararon para la inoculación experimental (cuadro 1).

Cuadro 1: Estimación de la carga microbiana total obtenida por el Método de Vertido en Placa

Dilución	Concentración estimada (UFC/ml*)
1:5	2.6×10^4
1:10	4.0×10^4
1:100	3.8×10^3
1:1,000	4.4×10^2
1:10,000	60
1:100,000	< 10

FUENTE: datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Control de Alimentos de la Unidad de Salud/BEU en el tercer trimestre de 2006.

*Unidades Formadoras de Colonia por mililitro

2) Inoculación experimental de muestras de leche pasteurizada

- Se compró un litro de leche pasteurizada (UHT) de marca conocida. De este litro se tomaron 15 muestras de 25 ml cada una, de las cuales 12 fueron inoculadas con las alícuotas de las últimas 4 diluciones (1:100; 1:1,000; 1:10,000 y 1:100,000) ya cuantificadas de *L. monocytogenes* (3 muestras por cada dilución). Las tres muestras

de leche restantes fueron utilizadas como controles negativos, ya que no fueron inoculadas con la bacteria.

- Todas las muestras, incluyendo los controles positivos y negativos, fueron analizadas para la determinación de *L. monocytogenes*, verificándose las reacciones de los medios de cultivo utilizados para el aislamiento e identificación de la bacteria (29, 56).

b. Recolección y transporte de muestras

Una vez establecida la metodología, se realizó el muestreo durante el tercer y cuarto trimestre del año 2006 y en el siguiente orden: 1) Unidad de Comercialización, 2) San José Pinula y 3) Antigua Guatemala.

Debido a que las vacas que usualmente ordeñan en la Unidad de Comercialización, no estaban en período de lactancia y tampoco se encontraban en edad de gestación al momento de iniciar la toma de muestras, se optó por recolectar las 25 muestras en dos fincas que proveen leche a dicha institución cuando ésta no cuenta con la producción necesaria para la demanda que presentan. De esta forma, se recolectaron 11 muestras en la primera finca -A-, 5 de leche fresca y 6 de leche refrigerada (almacenada en un tanque de refrigeración desde la tarde del día anterior) y 14 de leche fresca en la segunda -B-.

Las primeras 50 muestras de leche cruda, se recolectaron en forma directa de los tambos o tanques de almacenamiento (la leche fue homogenizada antes de ser recolectada), con un pichel de plástico o acero inoxidable no graduado y luego se depositaron individualmente en frascos estériles, debidamente identificados. Los frascos fueron transportados en un contenedor con hielo (temperatura aproximada de 4 °C, evitando congelar las muestras), para conservar las muestras hasta su llegada al Laboratorio de Control Microbiológico de Alimentos de la Unidad de Salud, Departamento de Bienestar Estudiantil de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Las 25 muestras provenientes de Antigua Guatemala, fueron transportadas en las mismas condiciones de temperatura,

pero no se utilizaron frascos estériles, sino que se trasladaron en el mismo recipiente en el que se compraron -bolsas de plástico y en envases de vidrio-.

c. Recolección de información

Luego de cada muestreo, se realizó una entrevista dirigida al propietario, encargado o empleado de cada lechería (Anexo 8) y centro de acopio (Anexo 9), con el propósito de obtener información acerca de las prácticas de manejo y producción aplicadas en cada sitio de muestreo y con ello, investigar la existencia de posibles riesgos potenciales, que podrían favorecer la contaminación de la leche con *L. monocytogenes*. En ciertos lugares, la entrevista fue verificada y complementada por un recorrido por las instalaciones de las mismas y también se obtuvo información adicional en ciertas preguntas.

d. Segunda Fase: Análisis Microbiológico

Debido a que la bacteria es altamente patógena, se realizaron todos los análisis bajo las más estrictas normas de bioseguridad, todos los procedimientos se realizaron dentro de una cabina de bioseguridad nivel II y por ningún motivo tuvieron acceso a las áreas de trabajo el siguiente grupo de personas: personal inmunocomprometido, ya sea por enfermedad o por el uso de medicamentos, mujeres embarazadas o personas de edad avanzada. Todas las áreas de trabajo fueron desinfectadas adecuadamente antes y después de realizar todos los procesos.

Las muestras se analizaron según la metodología para la identificación de *L. monocytogenes*, descrita en el Manual de Microbiología de Alimentos del Instituto de Nutrición de Centroamérica y Panamá –INCAP- (4, 29, 56, 59).

1) Enriquecimiento

- Con una pipeta estéril de 10 ml, se midieron 25 ml de leche y se mezclaron en un erlenmeyer conteniendo 225 ml de caldo de enriquecimiento *Listeria* (LEB).
- Se homogenizó adecuadamente
- Se incubó a 30 °C por 24 a 48 horas.

2) Aislamiento

- Se tomó con una asa en argolla una pequeña muestra del cultivo anterior (LEB) y se inocularon simultáneamente dos placas de agar Oxford. Con un asa en argolla, se esparció el inóculo utilizando una técnica de rayado por agotación para aislar colonias.
- Se incubaron las placas en posición invertida a 35 °C por 24 a 48 horas.
- Se buscaron colonias negras o con halo negro en la caja con agar Oxford.
- Se transfirieron 5 colonias típicas a agar tripticasa soya con 0.6 % de extracto de levadura (TSAYE). Se estrió para aislar las colonias.
- Se incubaron a 30 °C por 24 - 48 horas.

3) Identificación

Las pruebas de identificación se realizaron a partir de los cultivos en el agar tripticasa soya con 0.6 % de extracto de levadura (TSAYE).

- **Tinción de Gram:** se realizó una tinción de Gram a partir de cultivos de 24 a 48 horas. Todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos gram positivo. Sin embargo, en cultivos viejos pueden presentarse como formas cocoides (50).

- **Prueba de Catalasa:** en la superficie de una lámina portaobjetos, se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3 % y con un palillo de plástico o madera se suspendió en ella, una colonia sospechosa. La formación inmediata de burbujas indicó que la prueba era positiva. Las especies de *Listeria* son catalasa positivo. *Precaución:* la suspensión se realizó con una asa de plástico o palillo de madera estéril para evitar el contacto del metal con el reactivo (31, 50, 56).
- **Prueba de movilidad:** con una asa en hilo se tomó una pequeña cantidad de la(s) colonia(s) sospechosa(s) y se inocularon individualmente en el medio SIM. Se colocaron el o los tubos en una gradilla y se incubaron a temperatura ambiente por 7 días y luego se observó la presencia de crecimiento en forma de “sombrilla”.
- **Observación de Beta hemólisis:** con un asa en hilo se tomó una pequeña cantidad de una colonia y se inoculó en agar sangre de carnero al 5 %. Se estrió con asa en argolla y se incubó a 30 °C por 24 horas. Para identificar la colonia se observó la reacción hemolítica en las placas: *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* presentarían una zona clara (no tan definida) de beta hemólisis (halo claro alrededor de las colonias), *L. ivanovii* presentaría una zona clara bien definida y *L. innocua* no presentaría hemólisis.
- **Reducción de Nitratos:** se inocularon los tubos que contenían caldo nitrado con cada una de las colonias sospechosas. Se incubaron todos los tubos a 35 °C por 5 días. Luego se agregó a cada tubo 0.2 ml (4 gotas) del reactivo A (Anexo 10) y 0.2 ml (4 gotas) del reactivo B (Anexo 10), un color rojo indicó una prueba positiva. Al no observar este color, se adicionó una pizca de zinc en polvo; el desarrollo de un color rojo luego de unos minutos, indicó una prueba negativa.. De todas las especies de *Listeria* solamente *L. murrayi* da una reacción positiva.
- **Fermentación de Carbohidratos:** se inocularon tubos de caldo púrpura para fermentación de azúcares al 0.5 % - xilosa, ramnosa y manitol -. Se incubaron por 7 días a 35°C. Una coloración amarilla indicó una prueba positiva.

- **Prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP):** en una placa de agar sangre de carnero se sembró una estría de la cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* y, paralelamente una estría de la cepa ATCC 6939 de *Rhodococcus equi*, separadas lo suficiente para que entre éstas se pudieran estriar perpendicularmente las colonias sospechosas de *Listeria* spp sin que llegaran a tocarse (aproximadamente 5 mm de separación). Después de incubar 24 - 48 horas a 35 °C, se examinó la presencia de hemólisis.

e. Notificación de resultados

La Unidad de Salud del Bienestar Estudiantil de la Universidad de San Carlos de Guatemala, se encargó de notificar los resultados obtenidos a las lecherías y centros de acopio respectivos, así como al Departamento de Control de Alimentos y Medicamentos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

3. Diseño de investigación

- Tipo de muestreo:** la muestra fue obtenida de una manera no aleatoria, por conveniencia. Se consideró para el siguiente estudio un total de 75 muestras de leche cruda de vaca sin pasteurizar de 100 ml (volumen mínimo) cada una, provenientes de la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala y de centros de acopio y lecherías ubicadas en los municipios de San José Pinula y Antigua Guatemala.
- Unidad de observación:** centros de acopio y/o lecherías.
- Unidad de análisis:** leche cruda de vaca no pasteurizada (volumen mín: 100 ml)

- d. Tipo de estudio:** Descriptivo No Probabilístico. El estudio fue dividido en dos fases principales. **Primera fase:** estandarización de la técnica que se utilizó para la identificación de *L. monocytogenes* por medio de cepas ATCC control. **Segunda fase:** que incluyó el Análisis Microbiológico (enriquecimiento, aislamiento, identificación y confirmación de *L. monocytogenes*) de las muestras de leche.
- e. Variable de interés:** presencia de *L. monocytogenes* en las muestras de leche de vaca recolectadas.
- f. Interpretación de resultados:** los resultados obtenidos se interpretaron por medio de tablas y gráficas.

VIII. RESULTADOS

Durante la primera fase de este estudio, se estandarizaron todos los procedimientos mediante la utilización de una cepa control de *L. monocytogenes*, ya que se trata del primer estudio para la determinación de esta bacteria en el Laboratorio de Control de Alimentos de la Unidad de Salud. Se utilizó la cepa ATCC 19115 en lugar de la cepa ATCC 15313 que se había propuesto originalmente, ya que era la única cepa disponible en el Laboratorio Nacional de Salud (LNS) del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de la inoculación experimental, se estableció que la metodología utilizada en este estudio es capaz de detectar concentraciones menores a 10 UFC/ml (Unidades Formadoras de Colonia por mililitro) de *L. monocytogenes* en leche pasteurizada. Por lo que se demuestra la eficiencia de los procedimientos utilizados para la recuperación de cantidades mínimas de este patógeno.

Asimismo, los resultados obtenidos de las entrevistas realizadas en las lecherías (tabla 1), muestran que el 60 % de las fincas (3 de 5) realiza el ordeño de forma manual debido al reducido número de vacas con las que cuentan; el resto lo hace de forma mecánica (40 %) ya que ordeñan más de 30 vacas, dos veces al día. En las fincas A y E, trabajan de 5 a 6 personas; la leche que recolectan por la tarde la almacenan en tanques de refrigeración y la entregan con la leche fresca de la mañana siguiente a los camiones lecheros.

Se puede observar que el nivel de formación académica de todos los empleados de las 5 fincas, corresponde al nivel primario. Sólo en 3 de las fincas (60 %) se indicó que sus ordeñadores han recibido capacitación relacionada con las buenas prácticas de higiene (fincas A, B y E). Sin embargo, no se obtuvo información respecto a la frecuencia con que se imparten estas capacitaciones y si verifican el cumplimiento de las mismas.

Tabla 1: Determinación de posibles Fuentes y/o Factores de riesgo que pueden favorecer la contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes* en las fincas lecheras.

No.	Factor de riesgo y/o Fuente de contaminación	ESC. ZOOTECH. USAC		SAN JOSÉ PINULA		
		FINCA A	FINCA B	FINCA E	FINCA F	FINCA G
1	¿Qué tipo de ordeño utilizan?	Mecánico	Manual	Mecánico	Manual	Manual
2	¿Cuántas vacas ordeñan diariamente?	Más de 30	11 a 20	Más de 30	1 a 10	1 a 10
3	¿Cuántas veces ordeñan al día?	2	1	2	1	1
4	¿Cuántos trabajadores se dedican al ordeño?	5 a 6	1 a 2	5 a 6	1 a 2	1 a 2
5	¿Qué nivel de formación académica tienen estos trabajadores?	Primaria	Primaria	Primaria	Primaria	Primaria
6	¿Reciben estas personas algún tipo de capacitación relacionada con las buenas prácticas de higiene?	Si	Si	Si	No	No
7	¿Con qué frecuencia recolectan la leche los lecheros?	Diariamente	Diariamente	Diariamente	Diariamente	Diariamente
8	¿Utilizan parte de la producción diaria de leche para consumo propio?	Si	Si	Si	Si	Si
9	En caso de ser afirmativa la respuesta anterior: ¿Hierven la leche antes de consumirla?	Si	Si	No	Si	Si

FUENTE: datos obtenidos de entrevista realizada en lecherías muestreadas en el tercer y cuarto trimestre de 2006.

*Los nombres de las fincas están codificados por letras de acuerdo a la fecha de muestreo.

Por otro lado, todas las fincas mencionaron realizar la limpieza y desinfección del equipo y utensilios de ordeño. El 60 % emplea una combinación de detergentes y desinfectantes (refiriéndose en su mayoría al cloro) y el resto (40 %) los utiliza por separado. Asimismo, todas indicaron realizar el lavado y/o desinfección de pezones antes del ordeño. El 80 % limpia el área de ordeño de 1 a 2 veces por día y sólo la finca G lo hace de 1 a 2 veces por semana, debido a que cuenta sólo con 3 vacas. Además, se determinó que el 100 % utiliza agua de nacimientos naturales –agua procedente del subsuelo o de una montaña- para realizar la limpieza del equipo y utensilios de ordeño, la limpieza del ganado lechero y del personal. No se obtuvo información respecto a la cloración del agua.

...Continuación Tabla 1

No.	Factor de riesgo y/o Fuente de contaminación	ESC. ZOOTECH. USAC		SAN JOSÉ PINULA		
		FINCA A	FINCA B	FINCA E	FINCA F	FINCA G
10	¿Realizan algún tipo de limpieza del equipo y utensilios que utilizan para la recolección y almacenamiento de la leche?	Si	Si	Si	Si	Si
11	¿Qué utilizan para la limpieza del equipo y utensilios en donde recolectan y almacenan la leche?	Dorosan, Fastclin, ácido, detergente	Detergente, cloro	Cloro	Detergente	Detergente, cloro
12	¿Realizan algún tipo de limpieza a los pezones de las vacas antes de ordeñarlas?	Si	Si	Si	Si	Si
13	¿Con qué frecuencia realizan limpieza en el área de ordeño?	1-2 veces al día	1-2 veces al día	1-2 veces al día	1-2 veces al día	1-2 veces / semana
14	¿Cuál es el origen del agua que utilizan para la limpieza del equipo y utensilios de ordeño, la limpieza de las vacas y del personal?	Nacimiento	Nacimiento	Nacimiento	Nacimiento	Nacimiento

FUENTE: datos obtenidos de entrevista realizada en lecherías muestreadas en el tercer y cuarto trimestre de 2006.

*Los nombres de las fincas están codificados por letras de acuerdo a la fecha de muestreo.

También se observó que el 40 % de las fincas (2 de 5) realiza únicamente el análisis fisicoquímico, siendo estas las fincas A y E. Sólo el 60 % realiza chequeos periódicos para la detección de mastitis (fincas A, B y E) y el 80 % lleva un control médico-veterinario frecuente (vacunas, vitaminas y/o desparasitantes). Cabe mencionar, que sólo el 40 % de las fincas realiza chequeos médicos a los empleados (control odontológico, detección de paludismo, filarias) y en la mayoría no exigen la tarjeta de salud. Asimismo, es importante destacar que en todas las fincas se afirmó que las reses son alimentadas con pasto y concentrado (nunca con ensilaje) y que también tuvieron problemas de abortos en el ganado lechero, con una frecuencia aproximada de 1 a 2 abortos por año en algunas fincas y de 3 a 4 abortos por año en otras.

...Continuación Tabla 1

No.	Factor de riesgo y/o Fuente de contaminación	ESC. ZOOTEC. USAC		SAN JOSÉ PINULA		
		FINCA A	FINCA B	FINCA E	FINCA F	FINCA G
15	¿Qué análisis realizan a la leche que producen?	Fisicoquímico	No aplica	Fisicoquímico	Ninguno	Ninguno
16	¿Realizan chequeos para la detección de mastitis?	Si	Si	Si	No	No
17	¿Realizan algún control médico-veterinario?	Si	Si	Si	No	Si
18	¿Se realizan chequeos médicos a las personas que ordeñan?	Si	Si	No	No	No
19	¿Qué tipo de alimento le proporcionan al ganado lechero?	Pasto - Concentrado	Pasto - Concentrado	Pasto - Concentrado	Pasto - Concentrado	Pasto - Concentrado
20	¿Han tenido problemas de abortos en el ganado lechero?	Si	Si	Si	Si	Si

FUENTE: datos obtenidos de entrevista realizada en lecherías muestreadas en el tercer y cuarto trimestre de 2006.

*Los nombres de las fincas están codificados por letras de acuerdo a la fecha de muestreo.

Durante los recorridos que se hicieron en algunas fincas, se pudo observar lodo y estiércol en algunos sitios de ordeño y lugares donde se mantiene el ganado lechero así como presencia de otros animales (perros, cerdos, gallinas, ovejas, etc.) cerca de los sitios de ordeño. Sumado a esto, se observó que algunas de las instalaciones donde se realiza el ordeño no tienen el diseño adecuado (declives, suelo de concreto, etc.) que permita realizar una limpieza correcta.

El único centro de acopio incluido en el estudio indicó que recibe leche cruda de 21 a 30 fincas diariamente, por lo que los camiones recolectores recorren una distancia aproximada de 41 a 60 kilómetros para trasladarla. Durante todo el recorrido, la leche es

transportada en barriles de plástico con tapadera y sin ningún sistema de refrigeración hasta que llega al centro de acopio, en donde es sometida a varios análisis fisicoquímicos y microbiológicos para controlar su calidad. El agua que utilizan es entubada y emplean amonio cuaternario para la limpieza y desinfección de los recipientes en los que almacenan la leche (tabla 2). En este centro de acopio se dedican principalmente a la elaboración de otros productos lácteos como diferentes tipos de queso (fresco, ricota, de pita, etc) y crema, entre otros.

Tabla 2: Determinación de posibles fuentes y/o factores de riesgo que pueden favorecer la presencia de *L. monocytogenes* en la leche cruda que se procesa en centros de acopio.

No.	Fuente de contaminación y/o Factor de riesgo analizado	SAN JOSE PINULA
		Centro de Acopio C
1	¿De cuántas lecherías recolectan leche diariamente?	21 a 30
2	¿Cuántos kilómetros viajan los lecheros diariamente para recolectar la leche?	41 a 60
3	¿Utilizan algún sistema de refrigeración para transportar la leche hasta este centro de acopio?	No
4	¿Utilizan algún sistema de refrigeración para el almacenamiento de la leche?	Si
5	¿Cuál es el destino final de la leche que recolectan?	Elaboración de lácteos
6	¿Qué análisis realizan a la leche que recolectan?	Fisicoquímico y Microbiológico
7	¿Realizan algún tipo de limpieza de los recipientes que utilizan para el almacenamiento de la leche?	Si
8	¿Qué utilizan para la limpieza de los recipientes en donde almacenan la leche?	Amonio cuaternario
9	¿Cuál es el origen del agua que utilizan para la limpieza de los recipientes en donde almacenan la leche?	Entubada

FUENTE: datos obtenidos de entrevista realizada en centro de acopio en el tercer trimestre de 2006.

De acuerdo con esta información, se estableció que existen posibles riesgos que podrían favorecer la contaminación de la leche con *L. monocytogenes* en las fincas lecheras y centros de acopio.

De un total de 75 muestras de leche cruda analizadas, 31 resultaron sospechosas al observarse el desarrollo de varias colonias con características similares a las del género *Listeria* en agar Oxford. De estas 31 muestras se confirmó que sólo 9 (12 %) eran positivas para *Listeria* spp. Los resultados se muestran en la tabla 3 y anexo 12.

Tabla 3: Resultados obtenidos en la identificación de especies de *Listeria*

No. Muestra	Gram*	Catalasa	Hidrólisis de Esculina	Movilidad en sombra**	Indol	Beta-hemólisis	Reducción de Nitratos	Fermentación Carbohidratos			Prueba de CAMP		RESULTADOS
								Xilosa	Ramnosa	Manitol	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	
4	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>L. welshimeri</i>
5	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>
6	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>
7	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>L. welshimeri</i>
11	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>
37	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>
39	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>
40	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>
63	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>

FUENTE: datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Control de Alimentos de Unidad de Salud/BEU en el tercer y cuarto trimestre de 2006

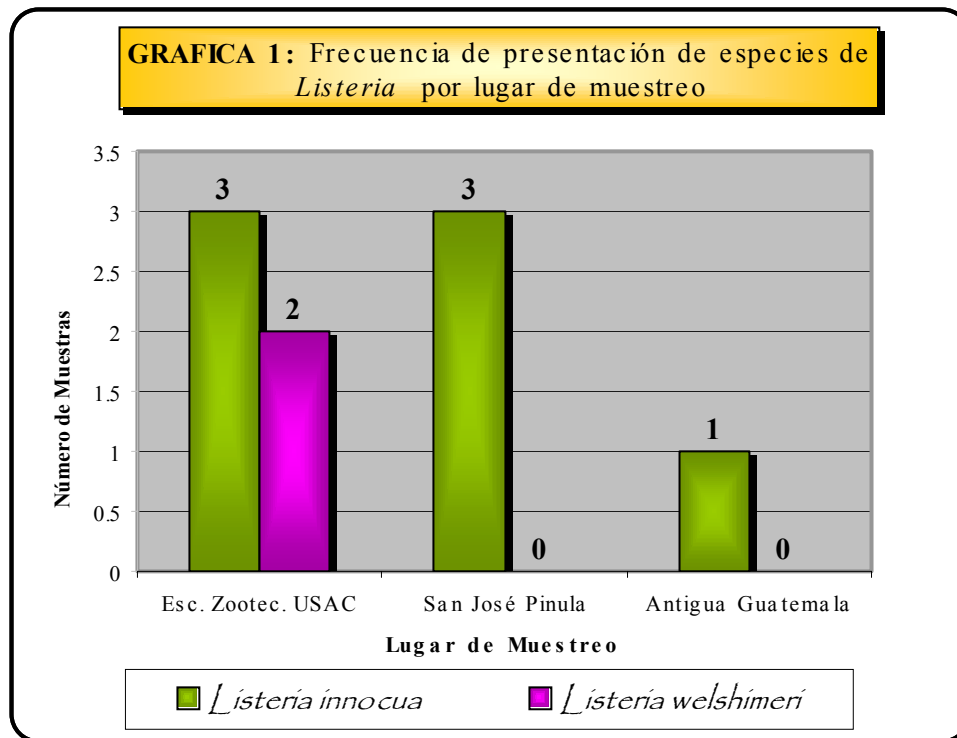
*Bacilos cortos Gram positivo **Incubación a temperatura ambiente por 7 días en medio SIM

Cabe mencionar que las muestras 4 y 5 eran de leche fresca (recién ordeñada) y las 6, 7 y 11 eran de leche refrigerada (almacenada en un tanque de refrigeración desde la tarde del día anterior). No se verificó la temperatura del tanque.

De las 75 muestras analizadas, 7 (9.33 %) fueron positivas a la presencia de *L. innocua* y 2 (2.67 %) para *L. welshimeri*. No se evidenció la presencia de *L. monocytogenes* ni de otras especies del género (ver anexo 13). Como una prueba adicional, que no se incluyó en la metodología original, se utilizaron los sistemas de identificación comerciales BBL Crystal y el API *Listeria*, para confirmar los resultados encontrados en las

pruebas bioquímicas convencionales. Asimismo, de las 9 (12 %) muestras positivas para *Listeria* spp, 5 (6.67 %) eran provenientes de la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, 3 (4 %) correspondían al centro de acopio C ubicado en San José Pinula y 1(1.33 %) pertenecía a la finca J ubicada en Antigua Guatemala (ver anexo 14).

De acuerdo con la gráfica 1, *L. innocua* fue la especie que se presentó con mayor frecuencia en los tres lugares de muestreo, mientras que *L. welshimeri* sólo se presentó en uno de ellos.



Fuente: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Control de Alimentos de Unidad de Salud/BEU en el tercer y cuarto trimestre de 2006.

Al concluir esta fase, la Unidad de Salud del Bienestar Estudiantil se encargó de notificar los resultados a las fincas y centros de acopio que colaboraron en la investigación, así como al Departamento de Control de Alimentos y Medicamentos del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social (anexo 15).

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Al evaluar los factores de riesgo en las fincas lecheras se estableció que el ordeño manual (el 60 % de las fincas utiliza este tipo de ordeño) representa un riesgo potencial, ya que se ha demostrado que el ordeñador (al entrar en contacto con la superficie y utensilios que están en contacto con la leche o al emplear prácticas inadecuadas de ordeño) puede actuar como un importante vector en la transmisión de *L. monocytogenes*. También puede serlo el tipo de recipiente que se utiliza para recolectar la leche, sobre todo si éste es de boca ancha (como la cubeta), porque es más probable que la leche se contamine con las heces de animales enfermos, con pelos y partículas de polvo adheridos a la superficie de la ubre y cola de la vaca (16, 51, 52).

Se ha señalado que el ordeñador puede llegar a jugar un papel importante en la contaminación de la leche con *L. monocytogenes*, sobre todo cuando el ordeño es manual y porque la mayor parte de las bacterias contaminantes provienen de cubetas donde se recolecta la leche, del equipo de la lechería, de la contaminación presente en corrales, personal y de fuentes similares -ver anexo 16- (3, 12). Por esta razón es necesario que los productores adopten medidas adecuadas que permitan eliminar o reducir al mínimo las principales fuentes de contaminación.

Respecto a la transmisión de enfermedades, sólo el 40 % de las fincas realiza chequeos médicos al personal de ordeño. Sin embargo, no en todas exigen la tarjeta de salud para laborar en ellas. Debe reconocerse que el ordeñador es el principal componente de todas las operaciones de ordeño y que por ello, los productores deben asegurarse de incluir un chequeo médico que logre diagnosticar aquellas enfermedades que pueden transmitirse a través del consumo de leche cruda. De acuerdo con el Codex Alimentarius, quienes manipulan la leche deben someterse a examen médico si así lo aconsejan motivos clínicos o epidemiológicos. Por otro lado, las personas de las que se sabe o se sospecha que sufren o son portadoras de una enfermedad con probabilidades de transmitirse a la leche, no deben entrar en zonas de manipulación del alimento (60).

Otro aspecto importante a considerar es que el 60 % de las fincas indicaron que sus empleados han recibido algún tipo de capacitación relacionada con buenas prácticas de higiene (BPH). La falta de BPH por parte de los empleados, desempeña un papel importante en la contaminación con *Listeria* de alimentos como la leche cruda. Por ejemplo, empleados que realizan la limpieza de los corrales o de cualquier otra área de la finca, aquellos que manejan los desechos o los que se encargan del cuidado de otros animales (cabras, ovejas, gallinas, peces, cerdos, etc.), no deberían entrar en contacto con la leche, ya que podrían contaminarla con la bacteria -contaminación cruzada- (60). Esta presencia podría considerarse un factor de riesgo importante, ya que en la mayoría de fincas es probable que no proporcionen la debida capacitación y supervisión para asegurar el cumplimiento de las mismas.

En algunas fincas se observó que hay sitios de ordeño y lugares donde se mantiene el ganado lechero que no reúnen las condiciones mínimas de limpieza, ya que había áreas con lodo y estiércol y presencia de otros animales (perros, cerdos, gallinas, ovejas, pájaros, etc.) cerca de los sitios de ordeño. Además, algunas de las instalaciones donde se realiza el ordeño no tienen el diseño adecuado (declives, suelo de concreto, etc.) que permita realizar una limpieza correcta. Según el Codex, las zonas donde se mantiene al ganado deben mantenerse limpias y libres de acumulaciones de estiércol, lodo, etc; las instalaciones donde se realice el ordeño deben estar ubicadas, construidas y mantenidas de una forma que reduzca al mínimo o impida la contaminación de la leche, deben ser fáciles de limpiar y mantenerse libres de animales no deseables como los mencionados anteriormente, cuya presencia podría traer como consecuencia la contaminación de la leche (33, 60).

Además, deben contar con un suministro apropiado de agua de calidad adecuada para su utilización en todas las labores relacionadas al ordeño (60). Es importante mencionar, que el agua puede contaminarse al pasar cerca de plantas de tratamiento de aguas negras o áreas con ganado u otros animales, convirtiéndose en una fuente importante de microorganismos patógenos. Por lo mencionado, el agua puede convertirse en una de las fuentes más importantes de contaminación de la leche cruda, sobre todo, si no es potable

(15). Al respecto, se determinó que en todas las lecherías no poseen agua potable, sino que utilizan el agua de nacimientos para realizar todas las labores relacionadas al ordeño, lo que podría representar un riesgo potencial para las lecherías, en el caso de que no reciba un tratamiento adecuado antes de ser utilizada (no se obtuvo información al respecto).

Por otra parte, en el 40 % de las fincas (2 de 5) se indicó que a la leche le realizan análisis fisicoquímicos pero no microbiológicos, a pesar que este último se considera más importante para asegurar la calidad e inocuidad de este producto alimenticio. En la mayoría de casos, las empresas que compran la leche (centros de acopio o plantas procesadoras) son las que realizan estos análisis, ya que son éstas las que definen su precio en base al contenido de sólidos totales (grasa, proteínas, lactosa y minerales). Sin embargo, la Comisión Ejecutiva de la Leche informó sobre la implementación de un novedoso sistema de pago, mediante el cual se le proporciona al productor un incentivo económico adicional por la calidad higiénica de la leche, motivando al productor lechero a tomar las medidas de higiene adecuadas para producir leche de mejor calidad (66, 67).

Para evitar que la leche sea un peligro potencial para el consumidor, ésta debe proceder de animales en buen estado de salud, a fin de que no afecte negativamente al producto final (60). Al respecto, el 60 % de las fincas indicaron realizar chequeos frecuentes para la detección de mastitis. La presencia de esta enfermedad en el ganado lechero, puede ocasionarle graves problemas tanto al productor como al consumidor, sobre todo cuando se presenta la mastitis subclínica. Este tipo de mastitis es difícil de diagnosticar debido a la ausencia de signos o síntomas, lo que significa que existe un riesgo debido a que la mayoría de productores sólo se percata de los animales que sufren de mastitis clínica. Además, en el desarrollo de mastitis puede intervenir *L. monocytogenes* (16, 17).

Se ha demostrado que *L. monocytogenes* es responsable de abortos espontáneos en el ganado lechero (4, 30). Un aspecto preocupante, es que en todas las fincas han tenido este tipo de problema, con una frecuencia de hasta 4 abortos por año. Si bien no se

comprobó que estos abortos hayan sido causados por *L. monocytogenes*, la probabilidad existe debido a la ubicuidad de dicho patógeno. Por eso es indispensable, llevar un control médico-veterinario frecuente, para monitorear el estado de salud en el que se encuentra el ganado lechero.

Según se mencionó, el mantenimiento inadecuado de la cadena de frío es uno de los factores de riesgo que se encuentra significativamente asociado a la contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes* (54, 58). A pesar de que este aspecto no estaba incluido en la entrevista, se observó que en la mayoría de fincas no refrigeran la leche después de terminar el ordeño. Este hecho no lo han considerado importante los productores, quizá porque el ordeño lo realizan durante la madrugada, cuando el clima todavía está considerablemente frío. Y además, el tiempo que tarda en pasar el camión lechero es de unas pocas horas (máximo 3 horas), lo cual les debe parecer relativamente corto.

Sólo la finca A utiliza un tanque de refrigeración para almacenar la leche que ordeñan por las tardes, ya que el ordeño se realiza dos veces al día. Sin embargo, la mayoría de muestras positivas (5 de 9) para *Listeria* spp, provinieron de esta finca y 3 de esas muestras, fueron tomadas del tanque de refrigeración. Es necesario recordar, que todas las especies de *Listeria* son capaces de desarrollarse a temperaturas de refrigeración y por ese motivo es importante mantener la integridad de la cadena de frío (la temperatura del almacenamiento en refrigeración). Según el Codex Alimentarius, los productos en refrigeración deben permanecer a una temperatura que no supere los 6 °C (preferentemente, 2 - 4 °C), debido a que la proliferación de *L. monocytogenes* se reduce considerablemente a temperaturas inferiores a los 6 °C (60).

Por otro lado, se debe tomar en cuenta que en los centros de acopio también existen varios factores de riesgo que pueden aumentar la probabilidad de que se pueda encontrar *L. monocytogenes*, no sólo porque la mayoría de ellos recibe diariamente la leche cruda de numerosas fincas sino porque además los camiones recolectores recorren grandes distancias

para trasladar esa leche hasta el centro y no utilizan ningún sistema de refrigeración para ese propósito.

Al respecto, el Codex Alimentarius señaló que la gestión para prevenir el riesgo de contaminación y/o introducción de este patógeno debería comenzar en la introducción de medidas para reducir los niveles de la bacteria en tipos específicos de producción primaria y en tomar medidas de higiene específicas relacionadas con el manejo del alimento, a través de la debida aplicación y verificación de las Buenas Prácticas de Higiene -BPH- y el Análisis de riesgos y puntos críticos de control -HACCP- (33).

Los resultados obtenidos a partir del análisis microbiológico, concuerdan con los informados por Mayorga (58), quien realizó un estudio en Chile en el 2004, donde obtuvo únicamente especies no patogénicas del género *Listeria* (*L. innocua* en un 6 % y *L. grayi* en un 2 %), pero no de *L. monocytogenes*. Así mismo, en un estudio realizado en Puerto Rico en el 2006 (61), se determinó la ausencia de este patógeno en leche cruda almacenada en tanques de enfriamiento de 37 lecherías. Tampoco se aislaron otras especies del género.

Estudios en otros países muestran resultados un tanto similares en cuanto a la determinación de *Listeria* spp, mas no para *L. monocytogenes*. En Canadá, Farber *et al.* (42) determinaron una incidencia general del 12.4 % para el género *Listeria*, identificando a *L. innocua* en un 9.7 %, *L. welshimeri* en un 1.3 % y a *L. monocytogenes* en un 1.3 %. En otra investigación, realizada en Brasil, Moura *et al.* (43) reportan 12.7 % de positividad para el género *Listeria*, aislando *L. innocua* y *L. monocytogenes* en un 9.5 % y *L. welshimeri* en un 0.9 %. Por otro lado, los resultados de Ahrabi *et al.* (45) en Turquía, determinaron una incidencia general del 10 % para el género *Listeria*, aislando *L. innocua* en un 8 %, *L. seeligeri* en un 2 % y *L. monocytogenes* en un 1 %.

Al analizar los resultados obtenidos en otras investigaciones y países, se puede apreciar que el porcentaje de aislamiento de *L. monocytogenes* en leche cruda, es bastante variado y oscila entre 0 % en algunos países como Italia y Nueva Zelanda, hasta un 34 %

en países como Colombia y una prevalencia mundial de alrededor del 2.2 %. Se ha demostrado que la prevalencia de *L. monocytogenes*, depende de factores como el área geográfica, la época, el tamaño del hato lechero y las prácticas de manejo y producción de la lechería, entre muchos otros (61).

La ausencia de *L. monocytogenes* en este estudio podría deberse a uno o varios factores. Según Mayorga (58), el bajo número de *L. monocytogenes* junto con el alto número de microbiota presente en la leche cruda (ver anexo 17), hace más difícil su aislamiento por ser ésta una bacteria que se inhibe frente a otros microorganismos. Flores (61) también señala que la microbiota habitual de la leche cruda puede inhibir y eliminar la presencia de ciertas cepas de *L. monocytogenes*, ya sea por medio de la competencia por nutrientes o por la producción de proteínas con acción bactericida (bacteriocinas).

Sumner *et al.* (62), refieren que algunas bacterias ácido lácticas (BAL) compiten a través de la producción de ácidos orgánicos y bacteriocinas. Estas bacterias disminuyen el pH del medio a niveles que son desfavorables para ciertas cepas de *L. monocytogenes* y otros patógenos. En lo que respecta a la producción de bacteriocinas, algunas especies del género *Lactobacillus*, producen 5 bacteriocinas diferentes -lacticina F, M y B, helveticina J y plantaricina A- que tienen efectos antagónicos sobre *L. monocytogenes*, al igual que *Lactococcus lactis* -nisina y diplococina- y *Streptococcus* sp -termofilina 347 y termofilina A- (61, 63).

Además, es bien reconocido que la leche cruda posee varias sustancias naturales antimicrobianas, que ayudan a eliminar la microbiota que pueda estar presente, incluyendo los patógenos. Entre estas se mencionan, la lactoferrina, algunas inmunoglobulinas y el sistema lactoperoxidasa-tiocianato-peróxido de hidrógeno (15, 58, 61, 63). El sistema de lactoperoxidasa, ha sido reconocido por sus efectos inhibitorios sobre ciertas cepas de *L. monocytogenes*, incluso a ciertas temperaturas de refrigeración; la actividad bactericida persiste aproximadamente por 5 días, previniendo el crecimiento y reduciendo

significativamente el número de *L. monocytogenes*, durante el almacenamiento en refrigeración de la leche cruda (58, 63).

Flores indica que otro de los posibles factores que puede contribuir a la ausencia del mencionado patógeno, es el empleo de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en las fincas. Estas incluyen los siguientes aspectos: buenas prácticas de ordeño, adecuada limpieza y desinfección del área, equipo y utensilios de ordeño; evitar el uso de agua contaminada, monitoreo frecuente del estado de salud del ganado por personal capacitado; evitar que personas enfermas participen en la labor de ordeño, entre otros. Sin embargo, este factor podría descartarse debido a que en este estudio se encontró la presencia de otras especies de *Listeria* (61).

Por otra parte, se ha demostrado que la presencia de *L. monocytogenes* también se ve afectada por los métodos de aislamiento empleados así como el tamaño y número de muestras estudiadas (58). Se ha señalado que puede existir una variación estacional en la incidencia de *L. monocytogenes*, ya que se ha detectado una menor positividad en la época seca, que también afectaría a las otras especies de *Listeria* (58). En esta investigación, la mayor parte (66.67 %) de las muestras se tomaron durante la época lluviosa (Unidad de Comercialización y San José Pinula) y el resto (33.33 %) se recolectaron durante la época seca (Antigua Guatemala), lo cual podría justificar por qué se encontraron más muestras positivas para *Listeria* spp en los dos primeros lugares mencionados (8 muestras en total), en comparación con el último (1 muestra).

Es importante destacar, que en varios de los casos reportados por la bibliografía (42, 45, 58, 65), incluyendo la presente investigación, *L. innocua* ha mostrado ser la especie aislada con mayor frecuencia (no sólo en la leche cruda sino también en otros productos alimenticios), seguido muy de cerca por *L. monocytogenes*. Al respecto, Cornu (64) señala que *L. innocua* tiene una ventaja selectiva sobre *L. monocytogenes* durante los procesos de enriquecimiento, el cual es atribuido a tasas rápidas de crecimiento y a la producción de compuestos inhibitorios, lo que podría explicar la ausencia de este patógeno en las muestras

de leche evaluadas. Además, el sobrecrecimiento de *L. innocua* durante los procesos de enriquecimiento, puede llegar a enmascarar a *L. monocytogenes* provocando un incremento en la presencia de falsos negativos (58, 64).

Sumner *et al.* (62) indican que, *L. innocua* se encuentra estrechamente relacionada con *L. monocytogenes* y que son tan pocas las diferencias entre ambas, que uno de los aspectos más interesantes es la frecuencia con que *L. innocua* es utilizada para modelar el comportamiento de *L. monocytogenes*. Al respecto, Mayorga (58) señala que *L. innocua* no fue reconocida como especie distinta de *L. monocytogenes* hasta 1981. Sumado a esto, la ubicuidad de *L. monocytogenes* en la naturaleza, hace que sea casi imposible su eliminación del medio ambiente. Por lo tanto, dada las similitudes entre ambas especies, no sería sorprendente encontrarlas juntas en el ambiente y en los productos alimenticios (62).

Es importante mencionar que a pesar de que las especies de *Listeria* encontradas en esta investigación no son patógenas para el hombre, su presencia indica una inadecuada manipulación de la leche y condiciones higiénicas deficientes en las lecherías. Es por esta razón el Codex Alimentarius mencionó que los programas de vigilancia eficaces pueden incluir pruebas para la detección de organismos de *Listeria* spp, ya que su presencia es un buen indicador de condiciones que favorecen la posible presencia de *L. monocytogenes* (60).

Finalmente, a pesar de que en este estudio no se obtuvieron aislamientos de *L. monocytogenes*, no se puede descartar su presencia ya que se trata de una bacteria ubicua y existe la posibilidad de encontrarla en algunos de los sitios de muestreo evaluados. Es importante recordar, que la contaminación por dicho patógeno puede ocurrir en cualquier paso en donde el producto se vea expuesto al medio ambiente, desde el proceso de ordeño, almacenamiento, transporte hasta en el hogar, por lo que se recomienda la aplicación de las normas de higiene correspondientes, no sólo para los productores y distribuidores, sino también para cada uno de los consumidores.

Para Guatemala, el nivel de tolerancia para los productos que requieren la determinación de *L. monocytogenes* es cero. Por lo tanto, la ausencia de este patógeno en la leche cruda, que se expende sin pasteurizar en localidades de San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la USAC, cumple con la norma legal en cuanto a la tolerancia cero y por el momento, no se considera un vehículo de transmisión de *L. monocytogenes*. Sin embargo, sí representa un riesgo potencial para la población consumidora ya que se encontraron otras especies del género.

Los datos epidemiológicos, en cuanto a la determinación de dicho patógeno, en leche cruda como en otros productos alimenticios que se venden en Guatemala, son muy limitados, por lo que los resultados de este trabajo de investigación, contribuyen a conocer la calidad actual de la leche cruda en nuestro país en relación con *L. monocytogenes*.

X. CONCLUSIONES

1. No se encontró la presencia de *Listeria monocytogenes* en la leche cruda que se comercializa sin pasteurizar en las localidades de San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Unidad de Comercialización de la Escuela de Zootecnia de la Facultad de Medicina Veterinaria de la USAC, por lo que cumple con la norma legal establecida en Guatemala, en cuanto a la cero tolerancia a este microorganismo.
2. La evaluación microbiológica de la leche cruda que se comercializa sin pasteurizar en las localidades mencionadas, permitió establecer que este alimento sí representa un riesgo potencial para la población consumidora en cuanto a la transmisión de *L. monocytogenes*, ya que se encontraron otras especies del género *Listeria*.
3. Del 100 % de muestras analizadas, el 12 % fueron positivas para *Listeria* spp, de las cuales el 9.33 % correspondieron a *L. innocua* y el 2.67 % a *L. welshimeri*.
4. Las especies de *Listeria* identificadas en este estudio aunque no son patógenas, indican una inadecuada manipulación de la leche y condiciones higiénicas deficientes de las lecherías, pues estas bacterias han sido aisladas del suelo, aguas residuales, materia fecal, etc.

XI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda continuar con estudios similares en otras regiones de Guatemala, con el fin de determinar la incidencia de *L. monocytogenes* a nivel nacional.
2. En base a los resultados recopilados, la Unidad de Salud debe realizar evaluaciones microbiológicas frecuentes en la leche cruda que se expende en la Unidad de Comercialización de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la USAC, con el propósito de establecer su inocuidad y prevenir el desarrollo de listeriosis en la población susceptible.
3. Como medida de control para prevenir el riesgo de contaminación y/o introducción de *L. monocytogenes* en las lecherías, los productores o instituciones correspondientes deben implementar cursos periódicos de capacitación dirigidos al personal que manipula la leche, relacionados con las Buenas Prácticas Agrícolas y al mismo tiempo deben verificar el cumplimiento de las mismas.
4. Por el riesgo constante de contaminación al que está expuesta la leche cruda, se deben realizar análisis ambientales, a modo de efectuar una búsqueda de las posibles fuentes asociadas a la contaminación de la leche cruda con *L. monocytogenes*, así como también un análisis de riesgos y puntos críticos de control (HACCP).
5. Llevar a cabo programas de información para educar a los consumidores, sobre los riesgos que conlleva la transmisión de *L. monocytogenes* y cómo prevenirla.
6. Capacitar al personal que participa en la producción y manipulación de los alimentos listos para el consumo, con respecto a las buenas prácticas de manufactura.
7. Realizar estudios futuros que determinen la incidencia o prevalencia de *L. monocytogenes* en otros alimentos implicados en la transmisión de dicho patógeno.
8. Que los resultados encontrados en este estudio impulsen a instituciones como Codex Alimentarius y Coguanor a establecer normas básicas que garanticen que las fincas y centros de acopio implementen correctamente las Buenas Prácticas Agrícolas y Buenas Prácticas de Manufactura.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quirós E. Impacto de la Calidad e Inocuidad de los Productos Lácteos en el Comercio Internacional. Cámara de Productores de Leche de Guatemala. Guatemala. NotiLeche. 2003;12: 12-15.
2. Reuben A, Treminio H, Arias ML, Chávez C. Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., en alimentos de origen animal en Costa Rica. ALAN. 2003;53: 389-392. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve>
3. Adams MR, Moss MO. Microbiología de los Alimentos. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A., 1997. 462 p.
4. Oteo J, Alos JI. Listeria y Listeriosis. Boletín CCS, revisión bacteriológica, Control de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid, España. 2003. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_bacte/listeria.htm
5. Teixidor JR, Massó JG. Medicina Interna. Barcelona, España: MASSON, S.A., Vols, 2, Vol. I, 1997. 3648 p.
6. Gálvez EM. Determinación de la contaminación por *Listeria monocytogenes* en quesos de producción comercial en Guatemala usando el método USDA. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1997. 51 p.
7. Chenal ZA. Determinación de la presencia de *Listeria monocytogenes* en camarones comercializados en la ciudad de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1997. 49 p.
8. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Informe sobre la conferencia electrónica de FAO sobre Acopio y Procesamiento de Leche en pequeña escala y países en desarrollo. Dirección de Producción y Sanidad Animal. Roma, 2001.
9. Raunhardt O, Bowley A. Boletín informativo, Leche: Fortification Basics, Mandatory Food Enrichment. Agency for International Development's Bureau for

- Global Health. No. 125. 03 marzo 2005. Disponible en: http://www.mostproyect.org/Zinc_Pub_Updates_feb05/leche.pdf
10. Diccionario de Medicina, OCÉANO MOSBY. Barcelona, España: Equipo Editorial: Gispert C. Océano Grupo Editorial, 1996. 1437 p.
 11. Majem S, Bartrina JA, Verdú JM. Nutrición y Salud Pública: Métodos, Bases científicas y Aplicaciones. Barcelona, España: MASSON, S.A, 1995. 401 p.
 12. Volk WA. Microbiología Básica. 7.ed. México, Distrito Federal: Harla, S.A, 1996.
 13. Kon SK. La Leche y los Productos Lácteos en la Nutrición Humana. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Italia, 1959. 80 p.
 14. Robinson RK. Microbiología Lactológica: Microbiología de la Leche. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S.A. Vols, 2, Vol. 1, 1987. 230 p.
 15. Ciencia y Tecnología de la leche: Microbiología de la leche cruda. Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Zulia. 2005. Disponible en: <http://www.members.tripod.com.ve/tecnología/documentos.htm>
 16. Magariños H. Guía para la pequeña y mediana empresa; Producción higiénica de la leche cruda. Santiago, Chile. 2000. 104 p. Disponible en: http://www.science.oas.org/OEA_GTZ/LIBROS/LA_LECHE/le_html/cap5_leche
 17. Fuentes G, Dieguez J, Rodríguez JL, et al. Mamitis subclínicas persistentes causadas por *Listeria monocytogenes* en vacuno lechero. Instituto de Investigación y Análisis Alimentarios. Facultad de Veterinaria del Lugo, Universidad de Santiago de Compostela. España, 2003.
 18. Fox, Cameron. Ciencia de los Alimentos, Nutrición y Salud. 3ª reimpresión. Trad: Ferrer G. México, Distrito Federal: Editorial Limusa, Grupo Noriega Editores, 1999. 458 p.
 19. Frasier WC, Westhoff DC. Microbiología de los Alimentos. 3ª. Edición. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S. A. 1985.
 20. Martínez PJ. La Leche y sus Derivados. 2004. Disponible en: <http://www.pmministries.com/ministeriosalud/Leche/Lecheyderivadosindex.htm>.

21. Schaller A, Labriola S, Guardini E. Leches Fluidas. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Lácteos, Dirección de Industria Alimentaria. Argentina. 2005. <http://www.alimentosargentinos.gov.ar/lacteos/default.asp>
22. Cañameras C, Saurina D. Alimentación: Leche pasteurizada o Esterilizada. 2006. Disponible en: <http://www.maristas.com.ar/champa/poli.htm>
23. Potter N. La Ciencia de los Alimentos. México, Distrito Federal: Edutex, S. A., 1978. 750 p.
24. Quirós E. Análisis del Sector Lácteo Centroamericano: primera parte. Cámara de Productores de Leche de Guatemala. Guatemala. NotiLeche. 2004; 16: 26-28.
25. Cámara de Productores de Leche de Guatemala. Presentación en Power Point: Situación Actual de la Ganadería Bovina de la pequeña Agricultura. Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola. Guatemala. 2004. 26 p.
26. Instituto Nacional de Estadística -INE-, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación -MAGA-, FAO. IV Censo Nacional Agropecuario, 2003. Número de fincas censales, existencia animal, producción pecuaria y características complementarias de la finca censal y del productor agropecuario. Guatemala; Tomos, 5, Tomo 4, 2005. 365 p.
27. Quirós E. Análisis del Sector Lácteo Centroamericano: segunda parte. Cámara de Productores de Leche de Guatemala. NotiLeche. Guatemala, 2004; 17: 20-23.
28. Instituto Geográfico Nacional de Guatemala. Base de datos de los departamentos de Guatemala y Sacatepéquez disponibles en el Programa ArcView Gis 3.2. Guatemala, 2002.
29. Cano F, Torres O, Pratdesaba R. Manual de Microbiología de los Alimentos: Laboratorios INCAP, 1995. 59 p.
30. Zinsser. Microbiología. 20^a ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana, S.A., 1997. 1696 p.
31. American Public Health Association -APHA-. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4^a ed. Washington: Edit by Frances Pouch Downes and Keith Ito., 2001. 676 p. (p.343-353).

32. Boerlin P, Boerlin-Petzol F, Jemmi T. Use of listeriolysin O and internalin A in a seroepidemiological study of listeriosis in Swiss dairy cows. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41(3): 1055-1061.
33. Codex Alimentarius. Anteproyecto de Directrices para el control de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Documentos CX/FH 03/8. Orlando, Florida: del 27 de enero al 1 de febrero de 2003. Comité del Codex sobre Higiene de los alimentos. Apéndice IV, 2002. 44 p.
34. Drevets DA. *Listeria monocytogenes* virulence factors that stimulate endothelial cells. *Infect. Immun.* 1998; 66(1):232- 238.
35. Crespo MP, Vélez JD, Castañeda CR, et al. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en un hospital de tercer nivel. *Colombia médica.* 1999; 30: 89-98.
36. Gellin BG, Broome CV, Bibb WF, et al. and the Listeriosis Study Group. The epidemiology of listeriosis in the USA-1986. Atlanta, Georgia. *Am. J. Epidemiol.* 1991;133(4):392- 401.
37. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, et al. *Color Atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology.* 5. ed. Philadelphia, Washington: Lippincott. Vols, 2, Vol. 1, 1997, 1395 p.
38. Michanie S. *Listeria monocytogenes*: la bacteria emergente de los 80. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. *Nutrar*, marzo de 2005.
39. Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, et al. Epidemic listeriosis associated with Mexican-Style cheese. *N. Engl. J. Med.* 1988;319:823-828.
40. Dalton CB, Austin CC, Sobel J, et al. An outbreak of gastroenteritis en fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *N. Engl. J. Med.* 1997;336(2): 100-105.
41. Graves LM, Hunter SB, Ong AR, et al. Microbiological aspects of the investigation that traced the 1998 outbreak of listeriosis in the United States to contaminated hot dogs and establishment of molecular sub typing-based surveillance for *Listeria monocytogenes* in the pulsenet network. *J. Clin. Microbiol.* 2005;43(5): 2350-2355.
42. Farber JM, Sanders GW, Malcolm SA. The presence of *Listeria* spp in raw milk in Ontario. Ottawa. *Can. J. Microbiol.* 1988;34(2): 95-100.

43. Moura SM, Destro MT, Franco BD. Incidence of *Listeria* species in raw and pasteurized milk produced in Sao Paulo, Brazil. *Int. J. Food Microbiol.* 1993;19(3):229-237.
44. Goulet V, Marchetti P. Listeriosis in 225 non-pregnant patients in 1995: clinical aspects and outcome in relation to predisposing conditions. France. *Scan. J. Infect. Dis.* 1996;28(4):367-374.
45. Ahrabi SS, Erguven S, Gunalp A. Detection of *Listeria* in raw and pasteurized milk. *Cent. Eur. J. Public Health.* Ankara, Turkey. 1998;6(3):254-255.
46. Kells J, Gilmour A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *Int. J. Food Microbiol.* 2004;91:167-174.
47. Centers for Disease Control and Prevention. Public Health Dispatch: outbreak of listeriosis-Northeastern United States, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2002;51(42):950-951.
48. Espinoza A, De la Torre M, Salinas M. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del Distrito de ICA, Enero – Marzo 2003. *Perú Med. Exp.* 2004; 21: 1-5. Disponible en: http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/Medicina_Experimental
49. Zamora BJ. Listeriosis de origen alimentario y sus medidas de prevención. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Agrarias. Escuela de Ingeniería en Alimentos. 1997. 11 Agosto 2004. 4 p.
50. Blanco MM. Recuperación de *Listeria monocytogenes* dañada subletalmente por efecto de la congelación. España: Universidad Complutense de Madrid, (tesis de graduación, Facultad de Veterinaria) 1994. 103 p.
51. Husu JR, Seppanen JT, Sivela SK, et al. Contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* on dairy farms. *J. Vet. Med. Ser. B.* 1990; 37(4): 268-275.
52. Yoshida T, Kato Y, Sato M, et al. Sources and routes of contamination of raw milk with *Listeria monocytogenes* and its control. *J. Vet. Med. Sci.* 1998;60(10):1165-1168.

53. Schöbitz R, Marín M, Horzella M, et al. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro Sur*. 2001;29(2).
54. Sanaa M, Poutrel B, Menard JL, et al. Risk factors associated with contamination of raw milk by *Listeria monocytogenes* in dairy farms. *J. Dairy Sci.* 1993;7(10): 2891-2898.
55. Cabrera S. *Listeria monocytogenes*: un nuevo reto para el Sector Alimentario. *Industria y Alimentos Internacional*. 2003. 20. Disponible en: <http://www.revistaindustriayalimentos.com>.
56. Hitchins AD. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. In: *Bacteriological Analytical Manual*. Chapter 10. 8^a ed. 2003. U.S. Food and Drug Administration, Centers for Food Safety & Applied Nutrition. Manual on line: <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-toc.html>
57. United State Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service, USDA/FSIS. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. In: *Microbiology Laboratory Guidebook*. Chapter 8. 3th ed. Athens, GA. 2005. 21 p. Disponible en: http://www.fsis.usda.gov/Ophs/Microlab/MIg_8_04.pdf
58. Mayorga MA. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda de tanques de frío en lecherías y tanques comunitarios provenientes de 9 sectores de la provincia de Cautín, IX Región. Chile: Universidad Católica de Temuco, (tesis de graduación, Facultad de Acuicultura y Ciencias Veterinarias) 2004. 34 p.
59. Meljem J. Método de prueba microbiológico para alimentos: determinación de *Listeria monocytogenes*. Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1195. Bienes y Servicios. México, Distrito Federal. 1996. 15 p.
60. Comisión del Codex Alimentarius. Informe de la 37^a reunión del comité del Codees sobre higiene de los alimentos. Programa conjunto FAO/ OMS sobre normas alimentarias. ALINORM 05/28/13. Apéndice II. Buenos Aires, Argentina. 2005. 127 p.
61. Flores M. Incidencia de los patógenos *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., en la leche cruda en los tanques de enfriamiento

- en vaquerías de Puerto Rico. Puerto Rico: Recinto Universitario de Mayagüez, (tesis de graduación, Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos) 2006. 82 p.
62. Sumner S, Williams R, Eifert J. Survival of *Listeria monocytogenes*, *Listeria innocua* and Lactic Acid Bacteria Species in Chill Brines. Department of Food Science and Technology, Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg, Virginia. 49 p.
63. Gaya P, Medina M, Núñez M. Effect of the Lactoperoxidase System on *Listeria monocytogenes* behavior in raw milk at refrigeration temperatures. Appl. and Environ. Microbiol. 1991; 57(11): 3355-3360.
64. Cornu M, Kalmokoff M, Flandrois JP. Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. Int. J. Food Microbiol. 2002; 73(2-3): 261-274.
65. Iramain MS, Pol M, Korol S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* en agua y leche cruda: Informe Preliminar. Buenos Aires, Argentina. 2005. 133-137.
66. Comisión Ejecutiva de la Leche. Manual del lechero...para ganar más dinero. Guatemala. Manual didáctico. 2,000. 33 p.
67. Morán E. Entrevista personal. Gerente General de la Cámara de Productores de Leche de Guatemala. Guatemala, ciudad.
68. Martino TK, Leyva V, Pérez A, et al. Determinación de *Listeria* spp en quesos y embutidos comercializados en Cuba. Rev. Cubana Salud Pública. 2005; 31(3): 0-0 Disponible en <http://www.scielo.sld.cu/scielo.php>
69. Gini G, García ML, Bran MC, et al. Manual de Laboratorio: Microbiología General. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. 2001. 82 p.
70. Castañón DE. Caracterización de la producción y comercialización de leche en Guatemala y opciones para mejorar el subsector. Boletín Temático. Base de datos IICA/DOC. Guatemala, Guatemala. 1995. 30 p.
71. González RF, Godoy JB. Los Riesgos Microbiológicos: riesgos asociados al consumo de leche. Consuma Seguridad. Barcelona, España. 2001. Disponible en: <http://www.consumaseguridad.com/ciencia-y-tecnologia/2001/11/07/528.php>

72. Ordóñez J, García G. Microorganismos de los Alimentos II, Métodos de muestreo para Análisis Microbiológicos: Principios y Aplicaciones Específicas. 2a. ed. Zaragoza, España: Editorial Acribia, S. A., 1992. 260 p.
73. Revilla A. Tecnología de la Leche: procesamiento, manufactura y análisis. 2a. ed. rev. 1a. reimpr. San José, Costa Rica: IICA: Levantex S. A., 1985. 400 p.
74. Sheff B, et al. El microbio del mes: *Listeria monocytogenes*. Nursing 2003;21:45-55.
75. Fisher P, Bender A. Valor nutritivo de los Alimentos. Centro Regional de ayuda técnica. Agencia para el desarrollo Internacional –AID-. México, DF: Editorial Limusa-Wisley, 1972. 206 p.
76. Bolaños F. Sí se puede producir Leche de calidad. Cámara de Productores de Leche de Guatemala. NotiLeche. Guatemala, 2001; 5:6-8.
77. Mahan L, Escott-Stump S. Nutrición y Dietoterapia de Krause. 9ª ed. Trad: Ocaña AM. México, Distrito Federal: McGraw-Hill Interamericana, 1998. 1208 p.
78. Codex Alimentarius Commission. Proposed Draft guidelines on the Application of General Principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Documentos CX/FH 05/37/5 preparado en la trigésimo séptima reunión, Buenos Aires, Argentina del 14 al 19 de marzo de 2005 del Comité de Higiene de los alimentos del Codex. 2004. 43 p.
79. Sánchez E, Castillo A, Ortega C. Infección Perinatal por *Listeria*: Serie de Casos. Hospital Central de la Policía. Bogotá, Colombia.
80. De Curtis ML, Franceschi O, De Castro M. *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. Caracas, Venezuela. ALAN 2002; 52: n. 3. Scientific Electronic Library Online. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve>
81. Sepúlveda A, Martínez NE, et al. *Listeria monocytogenes* como bioindicador sanitario para el control ambiental de las aguas incorporadas a los embalses. Editorial Ciencias Médicas. La Habana, Cuba. 2002; 40: 3. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/hie/vol40_3_02/hig07302.htm

82. Lozano JS. Manual de pasteurización de la FDA. Traducción del Manual “Milk Pasteurization Controls & Test”. Comisión Federal para la protección contra riesgos sanitarios. México, DF. 2002. 23 p.
83. Alonso B, Aragón V, Bengoechea JA, et al. Manual práctico de microbiología. Barcelona, España: MASSON S. A., 1995. 200 p.
84. Schett G, Herak P, Graninger W, et al. *Listeria* associated arthritis in a patient undergoing Etanercept therapy: case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* 2005;438(5): 2537-2541.
85. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Brock: Biología de los microorganismos. 10ª ed. Madrid, España. Pearson Prentice, 2004. 1096 p.
86. Mims C, Playfair J, Roitt I, et al. Microbiología médica. 2ª ed. Madrid, España: Harcourt Brace, 1999. 584 p.
87. Sánchez JG. Toxiinfecciones alimentarias: una patología emergente. Boletín CCS, revisión bacteriológica, Control de Calidad de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. España. 2003. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/Toxialim.htm
88. Gil P, Rodríguez JJ. Salmón ahumado y contaminación por *Listeria*. Boletín semanal, febrero 2006. Barcelona, España. 2004. Disponible en: <http://www.consumaseguridad.com/web/es/investigación/2004/09/02/14111.php>
89. Siegman-Igra Y, Levin R, Weinberger M, et al. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerg. Infect. Dis. J.* 2002;8(6): 153-157.
90. Citti R, Scaramelli A, González I. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso blanco duro tipo llanero del Distrito sanitario uno del Estado Aragua, Venezuela. *Rev. Fac. Cs. Vets.* 1999; 40(2): 101-110.
91. Martínez RE, Bettina L. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en atún fresco expedido en la ciudad de Cumaná, Venezuela. *RC.* 2004;14(4): 354-357. Disponible en: <http://www.serbi.luz.edu.ve/scielo.php>.

XIII. ANEXOS

ANEXO No. 1: Producción de leche de vaca. Número de fincas censales, número de vacas ordeñadas y producción de leche en un día, departamento de Guatemala. Mayo 2003.

Departamento	Leche de vaca		
	Número de fincas	Vacas ordeñadas	Litros de leche obtenidos
Total República	32820	162585	633294
Guatemala	1425	6246	39777
Guatemala	61	159	720
Santa Catarina Pinula	14	114	367
San José Pinula	336	2045	14643
San José del Golfo	44	204	748
Palencia	387	1008	6063
Chinautla	27	113	719
San Pedro Ayampuc	61	216	1430
Mixco	8	32	197
San Pedro Sacatepéquez	13	48	234
San Juan Sacatepéquez	194	430	1950
San Raimundo	73	252	1035
Chuarrancho	21	34	68
Fraijanes	39	497	3214
Amatitlán	64	255	1538
Villa Nueva	28	205	1944
Villa Canales	52	623	4861
Petapa	3	11	48

Fuente: IV Censo Nacional Agropecuario. 2003

ANEXO No. 2: Producción de leche de vaca. Número de fincas censales, número de vacas ordeñadas y producción de leche en un día, departamento de Sacatepéquez. Mayo 2003.

Departamento	Leche de vaca		
	Número de fincas	Vacas ordeñadas	Litros de leche diarios
Total República	32820	162585	633294
Sacatepéquez	198	930	10316
Antigua Guatemala	7	58	747
Jocotenango	-	-	-
Pastores	20	28	84
Sumpango	35	45	202
Santo Domingo Xenacoj	2	24	75
Santiago Sacatepéquez	20	89	1019
San Bartolomé Milpas Altas	4	140	518
San Lucas Sacatepéquez	18	34	167
Santa Lucía Milpas Altas	46	100	642
Magdalena Milpas Altas	13	14	71
Santa María de Jesús	3	21	66
Ciudad Vieja	8	24	319
San Miguel Dueñas	8	36	562
Alotenango	9	311	5798
San Antonio Aguas Calientes	5	6	46

Fuente: IV Censo Nacional Agropecuario. 2003

ANEXO No. 3: Población total. Distribución por municipio. Departamento de Sacatepéquez. 2004

MUNICIPIOS / AÑO	No. de habitantes
	2004
Alotenango	10,926
Antigua Guatemala	47,773
Ciudad Vieja	28,628
Jocotenango	32,446
Magdalena Milpas Altas	9,753
Pastores	13,682
San Antonio Aguas Calientes	10,458
San Bartolomé Milpas Altas	5,262
San Lucas Sacatepéquez	26,412
San Miguel Dueñas	10,001
Santa Catarina Barahona	3,920
Santa Lucía Milpas Altas	12,131
Santa María de Jesús	17,392
Santiago Sacatepéquez	25,990
Santo Domingo Xenacoj	9,413
Sumpango	31,192
Total Sacatepéquez	295,379

Fuente: Instituto Nacional de Estadística y Centro Latinoamericano de Demografía. Guatemala, abril de 1997.

ANEXO No. 4: Reacciones específicas para la identificación del género *Listeria*

PRUEBAS	RESULTADOS
Tinción de Gram ^a	Bacilos cortos gram positivo
Catalasa	+
Oxidasa	-
Producción de ácido a partir de glucosa	+
Hidrólisis de esculina	+
Hidrólisis de urea	-
Hidrólisis de gelatina	-
Voges-Proskauer	+
Rojo de metilo	+
Indol	-
Movilidad en forma de sombrilla [*]	+

^a Cultivos de 16 - 24 horas

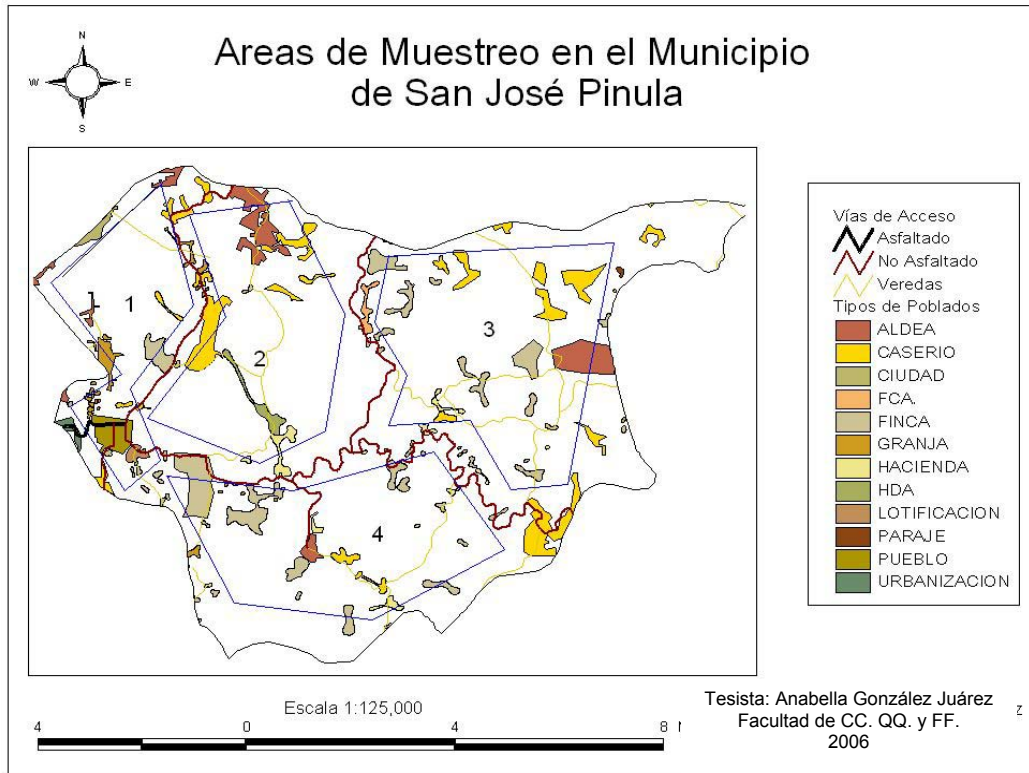
* Incubación a temperatura ambiente por 7 días en medio SIM

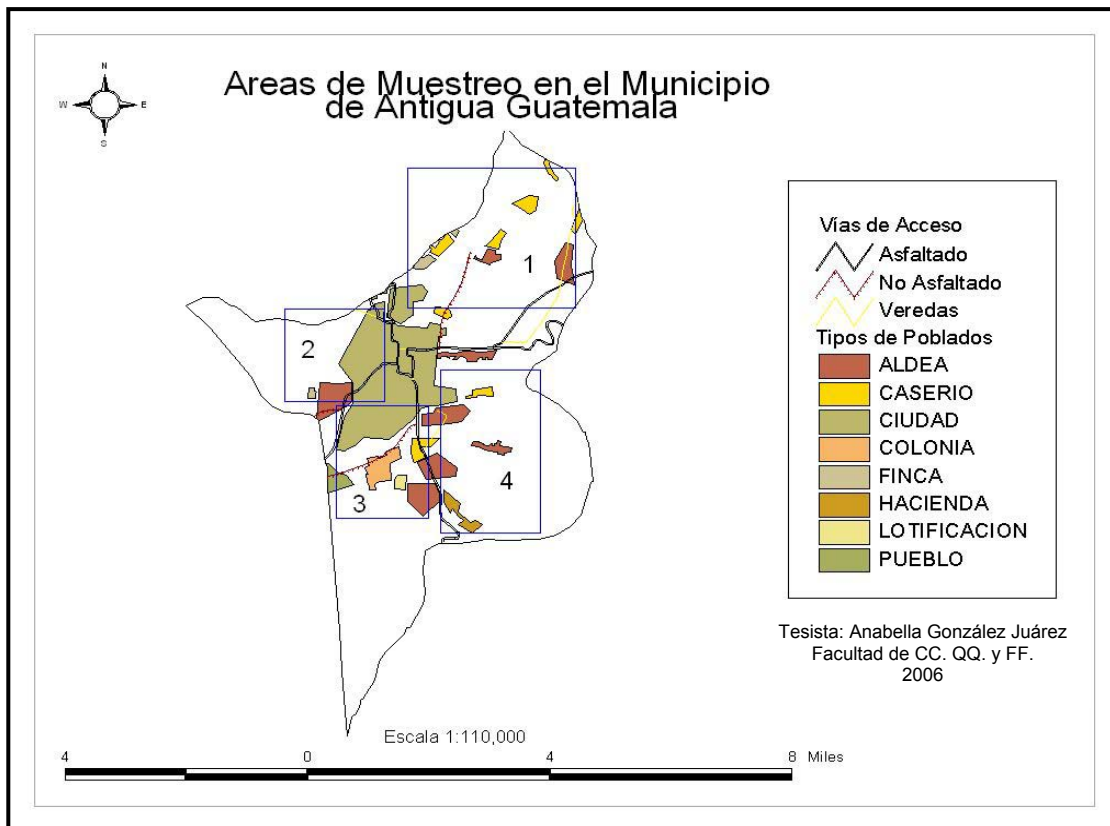
ANEXO No. 5: Reacciones específicas para la identificación de las especies del género *Listeria*.

REACCIONES/ESPECIES	Fermentación-Carbohidratos										Prueba de CAMP	
	Gram	Catalasa	Hidrólisis de Esculina	Movilidad en sombrilla*	Indol	B-hemólisis	Nitratos	Xilosa	Ramnosa	Manitol	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+
<i>L. innocua</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	v	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	v	-	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>L. grayi</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. murrayi</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	v	+	-	-

+ = Positivo - = Negativo v = Reacción variable * Incubación a temperatura ambiente por 7 días en medio SIM

ANEXO No. 6: Ubicación de áreas de muestreo en San José Pinula.



ANEXO No. 7: Ubicación de áreas de muestreo en Antigua Guatemala.

ANEXO No. 8

“Determinación de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca no pasteurizada y comercializada en localidades de San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala”

**Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Química Biológica**

**Estimado Señor:**

A continuación encontrará algunas preguntas acerca de las prácticas de manejo y producción de su lechería, la información que usted proporcione al contestar estas preguntas, será de gran utilidad para la presente investigación.

¡Muchas gracias por su colaboración!

ENTREVISTA

No. _____

Persona entrevistada (propietario o empleado): _____

Nombre de la Lechería: _____

Ubicación: _____

Fecha de muestreo: _____ **Hora:** _____

Por favor, señale su respuesta haciendo una marca en el cuadro que está junto a la respuesta que usted escoja.

1. ¿Desde hace cuánto tiempo se dedican a la producción lechera?
 - a. 0-5 años
 - b. 6-10
 - c. 11-15
 - d. Más de 15 años

2. ¿Cuántas vacas ordeñan diariamente?
 - a. 1-10
 - b. 11-20
 - c. 21-30
 - d. Más de 30

3. ¿Qué tipo de ordeño utilizan?
- a. Manual b. Mecánico
4. ¿Realizan algún tipo de limpieza a los pezones de las vacas antes de ordeñarlas?
- a. Sí b. No
- Especificar: _____
5. ¿Cuántas veces ordeñan al día?
- a. 1 b. 2
6. ¿Utilizan parte de la producción diaria de leche para consumo propio?
- a. Sí b. No
7. En caso de ser afirmativa la respuesta anterior: ¿Hierven la leche antes de consumirla?
- a. Sí b. No
8. ¿Con qué frecuencia recolectan la leche los lecheros?
- a. Diariamente b. Día por medio
9. ¿Qué tipo de alimento le proporcionan al ganado lechero?
- a. Pasto b. Ensilaje c. Concentrado d. Combinación
10. ¿Cuántos trabajadores se dedican al ordeño?
- a. 1-2 b. 3-4 c. 5-6 d. Más
11. ¿Qué nivel de formación académica tienen estos trabajadores?
- a. Primaria b. Básico c. Ninguna d. Otros

12. ¿Reciben estas personas algún tipo de capacitación relacionada con las buenas prácticas de higiene?

- a. Sí b. No

13. ¿Con qué frecuencia realizan limpieza en el área de ordeño?

- a. 1-2 veces al día b. 1-2 veces por semana c. Otros

Especificar: _____

14. ¿Realizan algún tipo de limpieza del equipo y utensilios que utilizan para la recolección y almacenamiento de la leche?

- a. Sí b. No

15. ¿Qué utilizan para la limpieza del equipo y utensilios en donde recolectan y almacenan la leche?

- a. Detergentes b. Desinfectantes c. Combinación d. Otros

Especificar: _____

16. ¿Cuál es el origen del agua que utilizan para la limpieza del equipo y utensilios de ordeño, la limpieza de las vacas y del personal?

- a. Potable b. Entubada c. Pozo d. Otro

Especificar: _____

17. ¿Qué análisis realizan a la leche que producen?

- a. Microbiológico b. Físicoquímico c. Ambos d. Ninguno

18. ¿Realizan chequeos para la detección de mastitis?

- a. Sí b. No

19. ¿Realizan algún control médico-veterinario?

a. Sí **b.** No

20. ¿Se realizan chequeos médicos a las personas que ordeñan?

a. Sí **b.** No

21. ¿Han tenido problemas de abortos en el ganado lechero?

a. Sí **b.** No

Observaciones: _____

ANEXO No. 9

“Determinación de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca no pasteurizada y comercializada en localidades de San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala”

Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Química Biológica



Estimado Señor:

A continuación encontrará algunas preguntas relacionadas a las prácticas de manejo de su centro de acopio, la información que usted proporcione al contestar estas preguntas, será de gran utilidad para la presente investigación.

¡Muchas gracias por su colaboración!

ENTREVISTA

No. _____

Persona entrevistada (propietario o empleado): _____

Nombre del Centro de Acopio: _____

Ubicación: _____

Fecha de muestreo: _____ **Hora:** _____

Por favor, señale su respuesta haciendo una marca en el cuadro que está junto a la respuesta que usted escoja.

1. ¿Desde hace cuánto tiempo se dedica al acopio de leche?
 - a. 0-5 años
 - b. 6-10
 - c. 11-15
 - d. Más de 15 años

2. ¿De cuántas lecherías recolectan leche diariamente?
 - a. 1-10
 - b. 11-20
 - c. 21-30
 - d. Más de 30

3. ¿Cuántos kilómetros viajan los lecheros diariamente para recolectar la leche?
- a. 1-20 b. 21-40 c. 41-60 d. Más de 60
4. ¿Utilizan algún sistema de refrigeración para transportar la leche hasta el centro de acopio?
- a. Sí b. No
5. ¿Utilizan algún sistema de refrigeración para el almacenamiento de la leche?
- a. Sí b. No
6. ¿Cuál es el destino final de la leche que recolectan?
- a. Venta directa b. Elaboración de lácteos c. Otros
7. ¿Qué análisis realizan a la leche que recolectan?
- a. Microbiológico b. Físicoquímico c. Ambos d. Ninguno
8. ¿Realizan algún tipo de limpieza de los recipientes que utilizan para el almacenamiento de la leche?
- a. Sí b. No
9. ¿Qué utilizan para la limpieza de los recipientes en donde almacenan la leche?
- a. Detergente b. Cloro c. Otros
- Especificar: _____
10. ¿Cuál es el origen del agua que utilizan para la limpieza de los recipientes en donde almacenan la leche?
- a. Potable b. Entubada c. Pozo d. Otro

ANEXO No. 10: Reactivos para la determinación de nitritos**Reactivo A**

Ingredientes	Cantidad
Alfa-naftilamina	6 gramos
Ácido acético 5N	1000 mililitros

Reactivo B

Ingredientes	Cantidad
Ácido sulfanílico	8 gramos
Ácido acético 5N	1000 mililitros

ANEXO 11: Porcentajes de respuesta de las entrevistas realizadas en las lecherías.

1. ¿Desde hace cuánto tiempo se dedican a la producción lechera?

a. 0-5 años	0 -----	0 %
b. 6-10 años	1 -----	20 %
c. 11-15 años	0 -----	0 %
d. Más de 15 años	4 -----	80 %

2. ¿Cuántas vacas ordeñan diariamente?

a. 1-10	2 -----	40 %
b. 11-20	1 -----	20 %
c. 21-30	0 -----	0 %
d. Más de 30	2 -----	40 %

3. ¿Qué tipo de ordeño utilizan?

a. Manual	3 -----	60 %
b. Mecánico	2 -----	40 %

4. ¿Realizan algún tipo de limpieza a los pezones de las vacas antes de ordeñarlas?

a. Sí	5 -----	100 %
b. No	0 -----	0 %

5. ¿Cuántas veces ordeñan al día?

a. 1	3 -----	60 %
b. 2	2 -----	40 %

6. ¿Utilizan parte de la producción diaria de leche para consumo propio?

a. Sí	5 -----	100 %
b. No	0 -----	0 %

7. En caso de ser afirmativa la respuesta anterior: ¿Hierven la leche antes de consumirla?

- | | | | |
|-------|---|-------|-------------|
| a. Sí | 4 | ----- | 80 % |
| b. No | 1 | ----- | 20 % |

8. ¿Con qué frecuencia recolectan la leche los lecheros?

- | | | | |
|------------------|---|-------|--------------|
| a. Diariamente | 5 | ----- | 100 % |
| b. Día por medio | 0 | ----- | 0 % |

9. ¿Qué tipo de alimento le proporcionan al ganado lechero?

- | | | | |
|----------------|---|-------|--------------|
| a. Pasto | 0 | ----- | 0 % |
| b. Ensilaje | 0 | ----- | 0 % |
| c. Concentrado | 0 | ----- | 0 % |
| d. Combinación | 5 | ----- | 100 % |

10. ¿Cuántos trabajadores se dedican al ordeño?

- | | | | |
|--------|---|-------|-------------|
| a. 1-2 | 3 | ----- | 60 % |
| b. 3-4 | 0 | ----- | 0 % |
| c. 5-6 | 2 | ----- | 40 % |
| d. Más | 0 | ----- | 0 % |

11. ¿Qué nivel de formación académica tienen estos trabajadores?

- | | | | |
|-------------|---|-------|--------------|
| a. Primaria | 5 | ----- | 100 % |
| b. Básicos | 0 | ----- | 0 % |
| c. Ninguna | 0 | ----- | 0 % |
| d. Otros | 0 | ----- | 0 % |

12. ¿Reciben estas personas algún tipo de capacitación relacionada con las buenas prácticas de higiene?

- | | | | |
|-------|---|-------|-------------|
| a. Sí | 3 | ----- | 60 % |
| b. No | 2 | ----- | 40 % |

13. ¿Con qué frecuencia realizan limpieza en el área de ordeño?

- | | | |
|-------------------------|---------|-------------|
| a. 1-2 veces al día | 4 ----- | 80 % |
| b. 1-2 veces por semana | 1 ----- | 20 % |
| c. Otros | 0 ----- | 0 % |

14. ¿Realizan algún tipo de limpieza del equipo y utensilios que utilizan para la recolección y almacenamiento de la leche?

- | | | |
|-------|---------|--------------|
| a. Sí | 5 ----- | 100 % |
| b. No | 0 ----- | 0 % |

15. ¿Qué utilizan para la limpieza del equipo y utensilios en donde recolectan y almacenan la leche?

- | | | |
|------------------------------|---------|-------------|
| a. Detergentes | 1 ----- | 20 % |
| b. Desinfectantes | 1 ----- | 20 % |
| c. Combinación de anteriores | 3 ----- | 60 % |
| d. Otros | 0 ----- | 0 % |

16. ¿Cuál es el origen del agua que utilizan para la limpieza del equipo y utensilios de ordeño, la limpieza de las vacas y del personal?

- | | | |
|------------------------|---------|--------------|
| a. Potable (Municipal) | 0 ----- | 0 % |
| b. Pozo | 0 ----- | 0 % |
| c. Otros | 5 ----- | 100 % |

17. ¿Qué análisis realizan a la leche que producen?

- | | | |
|-------------------|---------|-------------|
| a. Microbiológico | 0 ----- | 0 % |
| b. Fisicoquímico | 2 ----- | 40 % |
| c. Ambos | 0 ----- | 0 % |
| d. Ninguno | 2 ----- | 40 % |

18. ¿Realizan chequeos para la detección de mastitis?

- | | | |
|-------|---------|-------------|
| a. Sí | 3 ----- | 60 % |
| b. No | 2 ----- | 40 % |

19. ¿Realizan algún control médico-veterinario?

- | | | |
|-------|---------|-------------|
| a. Sí | 4 ----- | 80 % |
| b. No | 1 ----- | 20 % |

20. ¿Se realizan chequeos médicos a las personas que ordeñan?

- | | | |
|-------|---------|-------------|
| a. Sí | 2 ----- | 40 % |
| b. No | 3 ----- | 60 % |

21. ¿Han tenido problemas de abortos en el ganado lechero?

- | | | |
|-------|---------|--------------|
| a. Sí | 5 ----- | 100 % |
| b. No | 0 ----- | 0 % |

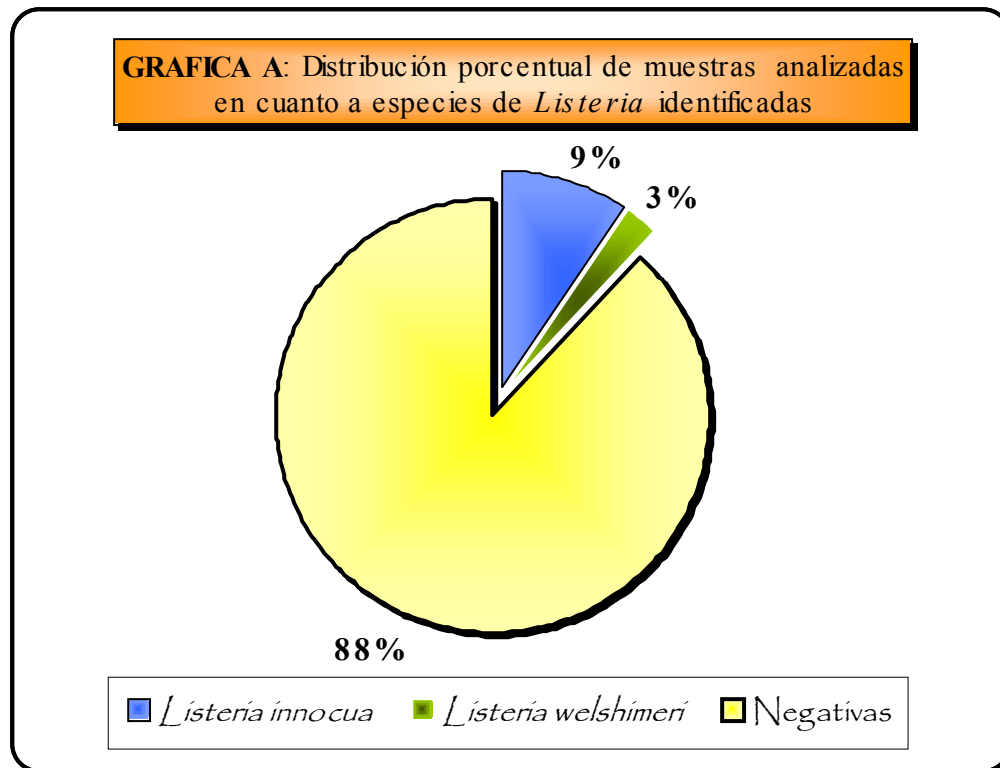
ANEXO 12: Resultados obtenidos en la determinación de especies de *Listeria* en leche de vaca no pasteurizada y comercializada en San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Segundo semestre de 2006.

No. Muestra	Fecha de Muestreo	Lugar de Muestreo	Lechería o Centro de Acopio**	Gram	Catalasa	Hidrólisis de Esculina	Movilidad en sombrilla*	Indol	Beta-hemólisis	Reducción de Nitratos	Fermentación Carbohidratos					Prueba de CAMP	RESULTADOS
											Xilosa	Ramnosa	Manitol	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>		
4	31-07-06	Esc. Zootec. USAC	A	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>L. welshimeri</i>	
5		Esc. Zootec. USAC	A	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
6		Esc. Zootec. USAC	A	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
7		Esc. Zootec. USAC	A	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	<i>L. welshimeri</i>	
11		Esc. Zootec. USAC	A	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
37	31-08-06	San José Pinula	C	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
39		San José Pinula	C	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
40		San José Pinula	C	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
63	13-11-06	Antigua Guatemala	J	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	<i>L. innocua</i>	

FUENTE: datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Control de Alimentos de Unidad de Salud/BEU en el tercer y cuarto trimestre de 2006.

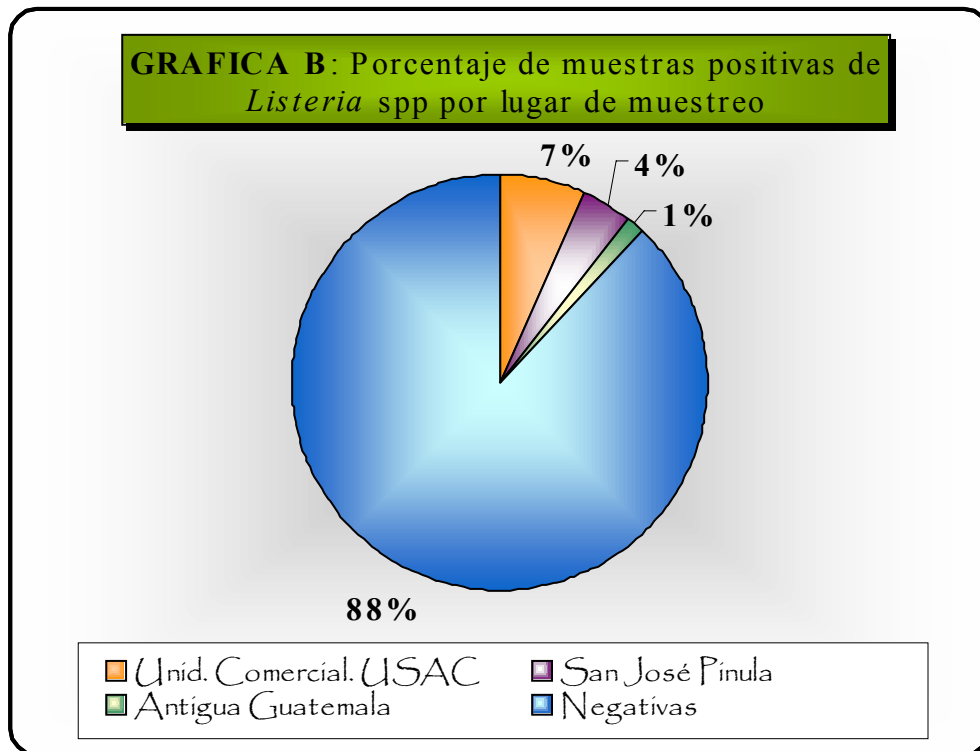
*incubación por 7 días a temperatura ambiente en medio SIM **Codificación por letras de acuerdo a la fecha de muestreo

ANEXO 13: Representación gráfica del porcentaje de muestras de leche cruda analizadas en cuanto a las especies de *Listeria* identificadas.



FUENTE: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Control de Alimentos de Unidad de Salud/BEU en el tercer y cuarto trimestre de 2006.

ANEXO 14: Representación gráfica del porcentaje de muestras positivas de *Listeria* sp en cuanto a su lugar de procedencia.



FUENTE: Datos experimentales obtenidos en el Laboratorio de Control de Alimentos de Unidad de Salud/BEU en el tercer y cuarto trimestre de 2006.

ANEXO 15: Formato de entrega de resultados.



Guatemala, █ de JULIO_ de 2007
Ref. 260607-0220

Licenciado (a)
Nombre Completo
Cargo Administrativo
Lugar de muestreo
Presente.

Licenciado (a) XXXXXXX:

Por este medio deseamos informarle los resultados microbiológicos de las muestras de leche cruda analizadas en el laboratorio de Control de Alimentos de la Unidad de Salud, en el mes de XXXX del 2006.

Análisis de leche cruda
Determinación de *Listeria monocytogenes*

MUESTRA	<i>Listeria monocytogenes</i>	Criterio Microbiológico AUSENTE	RESULTADO		Otras especies aisladas de <i>Listeria</i> spp
			APTO	NO APTO	
01	AUSENCIA	Satisfactorio	XXX	----	AUSENCIA
02	PRESENCIA	Insatisfactorio	----	XXX	PRESENCIA
03					
XX					

Recomendaciones	SE LE FELICITA Y SE LE EXHORTA A CONTINUAR REALIZANDO LAS BUENAS PRACTICAS DE MANUFACTURA , es de hacer notar que un análisis de producto terminado es el más recomendado. Además, se recomienda realizar de forma periódica auditorías de Buenas Prácticas Agrícolas, capacitar y supervisar de forma constante al personal que manipula la leche, debido a la vigilancia epidemiológica de la población consumidora (intoxicación alimentaria, infecciones, etc.).
------------------------	---

*FUENTE: Datos recabados en el trabajo de Tesis titulado "Determinación de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca no pasteurizada y comercializada en localidades de San José Pinula, Antigua Guatemala y en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala".

Respetuosamente;

Vo.Bo. Dr. Saúl Ernesto Rojas Castillo
Jefe De Unidad De Salud
Bienestar Estudiantil Universitario

Licda. Brenda López de Quevedo
Supervisora de Control Microbiológico
de Alimentos /Unidad de Salud

cc JEFATURA DE UNIDAD DE SALUD
Archivo ()

ANEXO 16: Fuentes de contaminación que contribuyen al aumento del recuento microbiano de la leche cruda.

Contribución de algunas fuentes de contaminación al recuento de colonias de la leche cruda¹.

<i>Fuente de contaminación</i>	<i>Contribución aproximada al recuento (ml⁻¹)</i>
Ubre de una vaca sana	Hasta algunos miles
Ubre de una vaca con mastitis	Hasta varios millones
Piel de la vaca	De cien hasta varios miles
Sala de ordeño (suelo, estiércol, polvo, aire)	Varios miles
Alimentación	Varios miles
Equipo de ordeño	De mil hasta varios millones
Agua de limpieza y aclarados	Hasta varios miles
Buen ordeñador	Muy poca

¹ Ejemplos aproximados.

Disponible en:

<http://www.academicos.cualtos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/doctos/26mar04/Microbiologia%20de%20la%20Leche.pdf>

ANEXO 17: Microorganismos que pueden estar presentes en la leche cruda.

Características de algunos microorganismos y grupos de organismos que son importantes en la leche y productos lácteos.

Nombre	Fuente	Crecimiento en leche cruda	Resistencia al calor	Patogenicidad	Alteración
<i>Bacillus anthracis</i>	Vaca enferma, suelo	-	+	Antrax	No
<i>Bacillus cereus</i>	Alimentación, estiércol, suelo, polvo	++	+	Intoxicación alimentaria	Coagulación dulce, «nata cortada» en la leche y nata pasterizadas
<i>Bacillus subtilis</i> y <i>B. stearothermophilus</i>	Alimentación, estiércol, suelo, polvo	++	+	Probablemente no	Alteración de la leche esterilizada
<i>Brucella abortus</i>	Vaca enferma	-	-	Contagioso: aborto (vaca) ¿fiebres de Malta? (humanos)	No
<i>Campylobacter jejuni</i>	Estiércol, agua	-	-	Desórdenes intestinales	No
<i>Clostridium botulinum</i>	Suelo, agua contaminada	-	+	Botulismo	No
<i>Clostridium perfringens</i>	Suelo, estiércol, agua contaminada	(+)	+	Desórdenes intestinales (leches infantiles)	No
<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	Suelo, ensilados, estiércol	-	+	No	«hinchazón tardía» de los quesos
Coliformes	Heces, utensilios de ordeño, agua contaminada	++	-	Mastitis, desórdenes intestinales	Alteración de la leche y del queso
<i>Corynebacterium bovis</i>	Canal del pezón	+	-	No	No
<i>Corynebacterium pyogenes</i>	Interior de la ubre, moscas	+	- (?)	Mastitis	Casi nunca
<i>Coxiella burnetii</i>	Ganado enfermo, estiércol	-	-	Fiebre Q (humanos)	No
<i>Lactobacillus</i> spp.	Utensilios de ordeño, leche en cántaras, sala de ordeño	++	-	No	Acidificación de la leche

..... Continuación de ANEXO 17

Nombre	Fuente	Crecimiento en leche cruda	Resistencia al calor	Patogenicidad	Alteración
<i>Lactococcus lactis</i>	Utensilios de ordeño, leche en cántaras, sala de ordeño	++	-	No	Leche acidificada
<i>Leptospira</i> (hardjo)	Ganado infectado, orina, agua contaminada, aguas superficiales		-	Leptospirosis	No
<i>Listeria monocytogenes</i>	Suelo alimentación, estiércol	+	-	Meningitis	No
<i>Microbacterium lacticum</i>	Utensilios de ordeño	+	+	No	Crece en productos pasterizados
<i>Micrococcus</i> spp. (1)	Canal del pezón, piel, sala de ordeño	+	-	Probablemente no	Casi nunca
<i>Micrococcus</i> spp. (2)	Utensilios de ordeño	+	+	No	Crece en productos pasterizados
Mohos	Polvo, superficies sucias, alimentación	+/-	-	Algunos producen toxinas	Alteraciones en queso, mantequilla, leche condensada
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Enfermedad de la vaca o del ordeñador	-	-	Mastitis, tuberculosis	No
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	Vaca	-	-	Débil	No
Psicrótrofos, por ej. <i>Pseudomonas</i>	Utensilios de ordeño, leche refrigerada, agua contaminada	++	-	¿Ocasionalmente?	Hidrolizan las proteínas y la grasa de la leche refrigerada
<i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i>	Estiércol, agua contaminada	+	-	Desórdenes intestinales, mastitis	No
<i>Staphylococcus aureus</i>	Canal del pezón, interior de la ubre, piel, ordeñador enfermo	++	-	Intoxicación alimentaria, mastitis, úlceras	Casi nunca
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Canal del pezón, piel, sala de ordeño	++	-	Probablemente no	Casi nunca
<i>Streptococcus agalactiae</i> , <i>S. dysgalactiae</i> , <i>S. pyogenes</i> , <i>S. uberis</i>	Interior de la ubre, sala de ordeño	++	-(?)	Mastitis	Acidificación
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Utensilios de ordeño, leche en cántaras, sala de ordeño	++	+	No	Acidificación
<i>Vibrio cholerae</i>	Agua contaminada, ordeñador enfermo	-	-(?)	Cólera	No
Virus	Vaca, humanos, sala de ordeño	-	±	Muchos sí lo son, por ejemplo, los virus de las enfermedades de los pies y de la boca	No
Levaduras	Polvo, utensilios de ordeño	+/-	-	No	Alteran el queso, mantequilla, leche condensada

¹ Un signo más significa que el organismo correspondiente no es destruido, o no lo es por completo, en un tratamiento a 63°C durante 30 min, que aproximadamente corresponde a uno de 72°C durante 20 s. Pueden existir diferencias de termorresistencia entre especies, e incluso entre cepas.

Disponible en:

<http://www.academicos.cuautlos.udg.mx/DiplomadoCalidadLeche/doctos/26mar04/Microbiologia%20de%20la%20Leche.pdf>

Br. Anabella González Juárez de Conde
AUTOR

Licda. Brenda López de Quevedo
ASESORA

Licda. María Luisa García de López
REVISORA

Dr. Roberto Flores Arzú
REVISOR

MSc. Vivian Lucrecia Matta de García
DIRECTORA

Ph.D. Oscar Cobar Pinto
DECANO