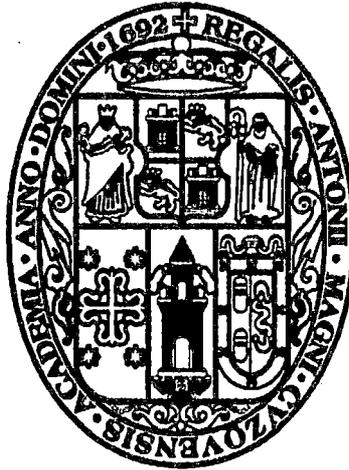


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO  
ABAD DEL CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**“EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES  
GERMICIDAS Y ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *Listeria  
monocytogenes* AISLADAS A PARTIR DE HORTALIZAS”**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO  
PROFESIONAL DE BIÓLOGO**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. Liz Emperatriz Astorga Oquendo**

**ASESORA:**

**Dra. Blga. Hedy Y. Espinoza Carrasco**

**CUSCO – PERÚ**

**2015**

**TESIS FINANCIADA POR LA UNSAAC**

## DEDICATORIA

*A Dios por acompañarme siempre, porque todo lo que tengo y soy es gracias a él.*

*A mi mami, Hilda por su confianza, apoyo y sacrificio, a ella cada uno de mis pasos se lo entrego con todo mi amor.*

*A mi papi, Antonio por darme el ejemplo digno de superación y entrega y por haberme dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia para conseguir mis metas.*

*A mis hermanos, Marco y Jossep por su cariño, confianza y la alegría que le ponen a cada uno de mis días.*

## AGRADECIMIENTOS

*Ya queda lejos aquel día en el que decidí emprender esta aventura.*

*Tenía muchas ganas e ilusión, y gracias al respaldo y contribución de muchas personas, he podido llegar hasta aquí. Quiero expresar las gracias a todas aquellas personas que directa o indirectamente han dejado su huella en este trabajo, y sin las cuales, este camino no hubiera sido igual.*

*En primer lugar, quiero agradecer a Dios por estar presente en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón, iluminar mi mente y poner en mi camino a personas tan maravillosas.*

*A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por abrirme sus puertas y brindarme la oportunidad de ampliar mis conocimientos en pro de mi superación personal y profesional, así mismo a los docentes de la Facultad de Ciencias Biológicas por los conocimientos ofrecidos durante mi formación profesional.*

*A mis asesora de tesis, la Dra. Blga. Heldy Y. Espinoza Carrasco, por la dirección de la presente tesis, por haberme abierto las puertas de su laboratorio para adquirir nuevos conocimientos e iniciarme en la investigación. Gracias por su confianza, consideración, buen sentido del humor y sobre todo por la AMISTAD incondicional que me brinda.*

*A todos mis amigos, ya que no hay palabras para describir lo que una amistad representa, sobre todo Karen Jordan Quispe.*

*A todas las personas con las que me he cruzado en el camino formando una parte de mí. GRACIAS!!!*

# CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCION

JUSTIFICACION

HIPOTESIS

OBJETIVOS

## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

<b>1.1 Antecedentes</b> .....	1
<b>1.2 Hortalizas</b> .....	4
1.2.1 Hortalizas involucradas en brotes de ETAS .....	6
<b>1.3 Listeria</b> .....	7
1.3.1 Clasificación del género Listeria .....	7
1.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	8
A. Posición taxonómica .....	8
B. Morfología .....	9
C. Movimiento .....	10
D. Distribución .....	10
E. Condiciones de supervivencia .....	12
1.3.3 Listeriosis humana .....	13
A. Origen y transmisión de la Listeriosis .....	13
B. Patogenia .....	13
C. Ciclo infeccioso .....	14
D. Características clínicas .....	17
E. Epidemiología .....	19
<b>1.4 Agentes germicidas</b> .....	20
1.4.1 Antisépticos y desinfectantes.....	20
A. Formaldehído .....	22
B. Hipoclorito de sodio .....	23
C. Ácido acético .....	24
D. Ácido cítrico .....	25
E. Tintura de Yodo .....	26

<b>1.5 Antibióticos</b> .....	27
1.5.1 Clasificación de los antibióticos .....	28
1.5.2 Mecanismo de acción.....	30
A. Inhibición de la síntesis de la pared celular.....	30
B. Alteración de la función de la membrana celular.....	30
C. Inhibición de la síntesis de proteínas.....	30
D. Inhibición de la síntesis o función de los ácidos nucleicos.....	31
<b>1.6 Método de Kirby Bauer modificado</b> .....	31
<b>1.7 Método M.I.C.E (Minimum Inhibitory Concentration Evaluators)</b> .....	32
<b>1.8 Perfil bioquímico para la identificación de <i>Listeria</i></b> .....	33
1.8.1 Sistema Miniaturizado API <i>Listeria</i> ... ..	33

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

<b>2.1 Área de estudio</b> .....	35
<b>2.2 Materiales</b> .....	35
2.2.1 Muestra .....	35
2.2.2 Cepas de ensayo .....	35
2.2.3 Material de muestreo .....	35
2.2.4 Medios de cultivo .....	35
2.2.5 Evaluadores de la Concentración Mínima .....	36
Inhibitoria (M.I.C.E)	
2.2.6 Agentes germicidas .....	36
2.2.7 Reactivos .....	36
2.2.8 Equipos .....	37
2.2.9 Materiales de vidrio .....	37
2.2.10 Otros materiales .....	37
<b>2.3 Metodología</b> .....	38
2.3.1 Muestreo y toma de muestra .....	38
2.3.2 Aislamiento de <i>Listeria spp</i> .....	39
2.3.2.1 Pre- enriquecimiento.....	39
2.3.2.2 Enriquecimiento.....	39
2.3.2.3 Aislamiento.....	39

2.3.3	Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	40
2.3.3.1	Perfil Bioquímico Convencional.....	40
2.3.3.2	Perfil Bioquímico Comercial.....	42
2.3.4	Cinética de crecimiento .....	44
2.3.5	Determinación de la sensibilidad a agentes germicidas por el método Kirby Bauer Modificado .....	44
2.3.6	Preparación de los agentes germicidas a diferentes Concentraciones.....	46
2.3.7	Determinación de la sensibilidad a antibióticos por el método M.I.C.E .....	46

### **CAPITULO III**

#### **RESULTADOS Y DISCUSION**

3.1	Aislamiento de <i>Listeria spp.</i> a partir de muestras de hortalizas .....	48
3.2	Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	49
3.3	Cinética de Crecimiento .....	53
3.4	Determinación de la sensibilidad de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	55
	Frente a agentes germicidas	
3.5	Determinación de la sensibilidad de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	64
	A antibióticos	

#### **CONCLUSIONES**

#### **RECOMENDACION**

#### **REVISION BIBLIOGRAFICA**

#### **ANEXOS**

## TABLAS

Tabla N° 1: Hortalizas de uso común .....	5
Tabla N° 2: Factores que impactan en el crecimiento y la supervivencia de <i>L. monocytogenes</i> . .....	12
Tabla N° 3: Síntomas clínicos asociados con la infección por <i>L. monocytogenes</i> . .....	17
Tabla N° 4: Clasificación de Antisépticos y Desinfectantes .....	21
Tabla N° 5: Espectro de actividad del ácido acético .....	25
Tabla N° 6: Clasificación de los antibióticos según su modo de acción. ....	29
Tabla N° 7: Tabla de identificación API Listeria .....	33
Tabla N° 8: Mercados y número de hortalizas muestreadas .....	38
Tabla N° 9: Concentraciones a prueba de los germicidas .....	45
Tabla N° 10: Preparación de los agentes germicidas .....	46
Tabla N° 11: Tipo y rango de la gradiente de concentración de los Antibióticos a prueba.....	47
Tabla N° 12: Distribución de <i>L. monocytogenes</i> .....	50
Tabla N° 13. Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en hortalizas .....	51
Tabla N° 14. Presencia de <i>L. monocytogenes</i> en mercados del Cusco .....	51
Tabla N°15. Diámetro de los halos de inhibición (mm) de cepas de <i>L. monocytogenes</i> sometidas a hipoclorito de sodio .....	55
Tabla N°16. Diámetro de los halos de inhibición (mm) de cepas de <i>L. monocytogenes</i> sometidas a ácido acético .....	56
Tabla N°17. Diámetro de los halos de inhibición (mm) de cepas de <i>L. monocytogenes</i> sometidas a ácido cítrico .....	57
Tabla N°18. Diámetro de los halos de inhibición (mm) de cepas de <i>L. monocytogenes</i> sometidas al formaldehido .....	58
Tabla N°19. ANOVA para el efecto de los agentes germicidas sobre .....	58

El crecimiento de *L. monocytogenes*

Tabla N°20. Prueba Post Hoc para la determinación de grupos homogéneos ...	59
Tabla N°21. Prueba Post Hoc para la determinación de grupos homogéneos.....	60
Tabla N°22. Prueba Post Hoc para la determinación de grupos homogéneos ....	61
Tabla N°23. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de <i>L. monocytogenes</i> .....	66

## FIGURAS

Figura N° 1: Microfotografía de microscopía electrónica de .....9 transmisión del bacilo <i>L. monocytogenes</i>	9
Figura N°2: Modos mediante los cuales <i>L. monocytogenes</i> se disemina en ..... 11 el ambiente, en los animales, en los alimentos y en las personas.	11
Figura N° 3: Etapas del ciclo de vida intracelular de <i>L. monocytogenes</i> . ..... 16	16
Figura N°4: Representación esquemática de la fisiopatología de la infección por Listeria..... 18	18
Figura N° 5: Fecha de introducción de diferentes .....28 antibióticos en la práctica clínica.	28
Figura N° 6: Forma de actuación de las tiras M.I.C.E ..... 32	32
Figura N°7: Forma de realización de la prueba de CAMP ..... 42	42
Figura N° 8: Desarrollo de cultivos de <i>Listeria spp.</i> en agares selectivos .....48	48
Figura N° 9. Perfil bioquímico de API Listeria .....49	49
Figura N°10. Cinética de crecimiento de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> .....54	54

## RESUMEN

*Listeria monocytogenes* es una bacteria muy patógena para el ser humano, causa infecciones denominadas listeriosis, la cual tiene una alta tasa de mortalidad, que se incrementa en los individuos más susceptibles como en recién nacidos, mujeres embarazadas, ancianos y personas inmunodeprimidas. Produce diversas patologías como abortos, meningitis, meningoencefalitis y septicemias. La vía principal de transmisión de *L. monocytogenes* es por el consumo de alimentos contaminados.

Para el presente trabajo de investigación, se tomaron 100 muestras de hortalizas expandidas en los mercados: Central de San Pedro, Rosaspata, Ttío, Wanchaq y Vinocanchón de la ciudad del Cusco durante los meses de Diciembre 2014 a Enero 2015, para evaluar la sensibilidad a agentes germicidas y antibióticos en cepas de *L. monocytogenes* aisladas a partir de las hortalizas colectadas.

Se aisló *Listeria spp.* en 25% de las muestras de espinaca, lechuga, rabanito, tomate y zanahoria. Seguidamente se identificó *L. monocytogenes* en 2% de las muestras de hortalizas mediante el sistema miniaturizado API Listeria. La cinética de crecimiento evidenció que *L. monocytogenes* alcanza la fase estacionaria en 12 horas, tiempo en que fueron enfrentados a los agentes germicidas hipoclorito de sodio, ácido acético, ácido cítrico y formaldehído a diferentes concentraciones.

Mediante el método de Kirby Bauer modificado se determinó que *L. monocytogenes* es sensible al formaldehído a la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del 2% comparada con la solución patrón de yodo 2% aun cuando ésta bacteria patógena se encuentra en fase estacionaria, pudiendo ser usado para el control y eliminación de *L. monocytogenes* mediante la desinfección de superficies, equipos, instalaciones de plantas procesadoras de alimentos mas no para hortalizas. Fue sensible al ácido acético a la CMI de 26%, sin embargo fue resistente al hipoclorito de sodio 4% y al ácido cítrico 31%.

Finalmente se determinó que *L. monocytogenes* es sensible en 100% frente a Ampicilina, Penicilina, Eritromicina, Gentamicina y Vancomicina mediante el método M.I.C.E (Minimum Inhibitory Concentration Evaluators). Es así que la Ampicilina tuvo la CMI<sub>90</sub> más baja de 0.06 y 0.12 µg/mL. De esta manera se

demuestra que el patrón de sensibilidad de *L. monocytogenes* frente a los 5 antibióticos permanece estable.

## INTRODUCCION

El género *Listeria spp.* corresponde a bacterias coco bacilos Gram positivos, móviles. Son microorganismos ubicuos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, en el suelo, agua, abonos orgánicos, vegetación y aguas residuales. Actualmente se han descrito ocho especies de éste género, considerándose sólo a *Listeria monocytogenes* como un patógeno animal y humano (Fajardo O. y col., 2008).

El impacto que tiene *L. monocytogenes* a nivel de salud, está al ser responsable de una enfermedad llamada "listeriosis", la cual afecta principalmente a poblaciones de riesgo tales como: mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos y personas inmunocomprometidas, como pacientes VIH positivo, o con afecciones crónicas como cirrosis, entre otras; causando diversas patologías como abortos, partos prematuros, meningitis, meningoencefalitis y septicemia. Debido al auge que han tenido, la gravedad y los múltiples daños que la listeriosis causa al ser humano han llamado la atención de autoridades relacionadas al ámbito de la salud a nivel mundial tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), (Thévenot D. y col., 2006).

La transmisión de *L. monocytogenes* por el consumo de alimentos es reconocida desde 1980 como vía principal. Ésta bacteria ha sido aislada de diversas hortalizas, tales como tomates, zanahorias, lechugas, repollos, espinacas, pepinos, judías, coliflores, brócolis, entre otras, en las cuales la contaminación es variable y se ve influenciada por el lugar de cultivo, la zona de recolección, los abonos, la temperatura, los procedimientos de lavado, el contacto con el suelo y las condiciones higiénicas durante el expendio. Sin embargo, ésta bacteria patógena puede ser eliminada mediante un tratamiento de desinfección adecuado, haciendo uso de agentes germicidas eficaces (Carrasco., 2007).

Para la desinfección se usan germicidas, que vienen a ser sustancias que destruyen microorganismos (pero no esporas); éstos pueden ser antisépticos o desinfectantes; los cuales constituyen una línea de defensa para evitar la diseminación de patógenos resistentes. Entre algunos de estos germicidas eficaces contra *L. monocytogenes* se tiene: hipoclorito de sodio, formaldehído,

ácido acético, ácido láctico, amonio cuaternario, alquin amin betaina, etc (Rojas C., 2007).

Los antibióticos son sustancias que destruyen los microorganismos patógenos (acción bactericida) o detienen su desarrollo (acción bacteriostática). El patrón de sensibilidad a los antibióticos de *L. monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años: es sensible "*in vitro*" a una amplia gama de antibióticos como Penicilina, Ampicilina, Gentamicina, Eritromicina, Tetraciclinas, Rifampicinas, Cotrimoxazol y Vancomicina, en cambio las cefalosporinas actuales presentan una pobre actividad, especialmente las de tercera y cuarta generación como Cefotaxima y Cefepima y todas las cepas son resistentes a Fosfomicina (Torres K. et al., 2005). Sin embargo, una revisión de los últimos años sobre los posibles cambios en el patrón de susceptibilidad a antibióticos en *L. monocytogenes*, han demostrado la habilidad de la bacteria de desarrollar resistencia a uno o más antibióticos (Poros-gluchowska J. y col., 2003).

Por ello esta investigación está orientada a evaluar la sensibilidad a agentes germicidas y antibióticos en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de hortalizas que son expandidas en los principales mercados de la ciudad del Cusco.

## JUSTIFICACION

Las hortalizas son parte importante de la dieta de las personas, y son percibidos como productos frescos, saludables y fáciles de preparar, su composición provee suficientes nutrientes y condiciones que hacen que sean ideales para el desarrollo de microorganismos deterioradores y patógenos, por lo que son asociados con infecciones microbianas. Sin embargo pueden contaminarse en cualquier etapa del procesamiento, cosecha, distribución hasta el consumo del mismo y debido a que se consumen de manera cruda y sin ningún tratamiento que garantice su inocuidad por lo que representan un riesgo (Pangloli P. y col., 2013). Además es contaminante frecuente de plantas procesadoras de alimentos, llegando a contaminar superficies que contactan con los alimentos (AESAN., 2011).

La población del Cusco tiene una alta demanda de éstos productos y entre los principales mercados de comercialización de hortalizas se encuentran Wanchaq, Ttío, Central de San Pedro, Vinocanchón y Rosaspata.

A pesar de que en el Perú existen normativas como la Resolución Ministerial N° 591- 2008 MINSA, denominada "Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano", con el fin de garantizar la seguridad sanitaria de los alimentos destinadas al consumo humano, ha sido complejo manejar ésta situación. En ésta normativa se indica para el caso específico de frutas y hortalizas, la ausencia de *L. monocytogenes* en 25 gr. de producto (MINSA., 2008).

*L. monocytogenes* produce una enfermedad denominada Listeriosis, en el Perú el Ministerio de Salud (MINSA) sólo en la región de La Libertad, ha reportado oficialmente 42 casos de listeriosis entre los años 2001 y 2008 (MINSA., 2009).

A pesar de ser una enfermedad considerada inusual por la presencia de casos esporádicos, su índice de mortalidad es muy elevado, el cual varía entre 20 y 30%, alcanzando un 70% en casos de meningitis, 50% en septicemia y hasta 80% en infecciones neonatales (FDA., 2011), siendo este uno de los motivos que concita su interés y también de ahí la importancia de prevenir ésta patología.

La primera línea de defensa para prevenir y evitar la diseminación de éste patógeno es la desinfección. Para la desinfección se usan germicidas, entre

algunos de éstos germicidas químicos eficaces contra *L. monocytogenes* sobre superficies inertes se tiene al hipoclorito de sodio y alquin amin betaina (Rojas C., 2007). También se encuentra la povidona, gluconato de clorhexidina, glutaraldehido, cloramina T y formaldehido (Best M. y col., 1989).

Los ácidos orgánicos prometen ser una alternativa viable en el intento de reducir el amplio uso del cloro en la desinfección de hortalizas crudas, dado que los ácidos orgánicos son reconocidos por su buen desempeño como antimicrobianos y por su condición de productos GRAS (Generally Recognized As Safe). Su actividad antimicrobiana está directamente ligada al pH, por cuanto la mayoría de los microorganismos no resisten valores inferiores a 4.0 (Beuchat L. 1998). Se ha demostrado que el ácido cítrico y el ácido láctico son efectivos para reducir *L. monocytogenes* en hortalizas como lechugas frescas (Akbas M. y col., 2007).

Con respecto al tratamiento indicado para pacientes con listeriosis, se han agrupado en medicamentos de elección primaria y de elección secundaria. Estos primeros corresponden a la Ampicilina y por asociaciones con un aminoglucósido y en los medicamentos de elección secundaria se encuentran antibióticos como el Cloranfenicol, Eritromicina, Tetraciclina y Rifampicina (OMS., 2004). Una revisión de los últimos años sobre los posibles cambios en el patrón de susceptibilidad a antibióticos y germicidas en *L. monocytogenes*, han demostrado la habilidad de la bacteria de desarrollar resistencia a antibióticos y sobre todo a germicidas. (Hernández B. y col., 2004).

Por todo lo referido anteriormente surge la inquietud de evaluar la sensibilidad a agentes germicidas y antibióticos en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de hortalizas que se expenden en los principales mercados de la ciudad del Cusco, con la finalidad de conocer los germicidas más eficaces que puedan ser usados para el control y eliminación de *L. monocytogenes* en hortalizas, superficies y equipos; así como también conocer el perfil de sensibilidad antimicrobiana de *L. monocytogenes* y de ésta manera puedan ser administrados cuando ocurran casos de listeriosis.

## FORMULACION DEL PROBLEMA

¿Cuáles serán los agentes germicidas y antibióticos más efectivos contra las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de hortalizas expandidas en mercados de la ciudad del Cusco?

## HIPOTESIS

Las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de hortalizas son sensibles ante los agentes germicidas y antibióticos propuestos.

## OBJETIVOS

### Objetivo General:

Evaluar la sensibilidad a agentes germicidas y antibióticos en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de hortalizas provenientes de cinco mercados en la ciudad del Cusco.

### Objetivos específicos:

1. Aislar *Listeria spp.* de hortalizas: lechuga, espinaca, tomate, zanahoria y rabanito expandidas en cinco mercados principales del Cusco.
2. Identificar cepas de *Listeria monocytogenes* obtenidas de las muestras de hortalizas mediante el Sistema Miniaturizado API Listeria.
3. Realizar curvas de crecimiento de las cepas de *Listeria monocytogenes* para identificar la fase estacionaria.
4. Evaluar la sensibilidad de *Listeria monocytogenes* frente a cuatro agentes germicidas (hipoclorito de sodio, ácido acético, ácido cítrico y formaldehído) por el método Kirby Bauer Modificado.
5. Evaluar la sensibilidad de *Listeria monocytogenes* frente a cinco antibióticos (Ampicilina, Penicilina, Eritromicina, Gentamicina y Vancomicina) por el método M.I.C.E (Minimum Inhibitory Concentration Evaluators).

## CAPITULO I

### MARCO TEORICO

#### 1.1 ANTECEDENTES

- **Vega P. y col 2013 (Perú).** Determinaron la sensibilidad antibacteriana de 7 cultivos de *Listeria monocytogenes* aislados de lugares de expendio de pollo y queso fresco en los mercados de la ciudad de Trujillo frente a once antibióticos mediante la técnica de difusión en placa. Es así que encontraron una sensibilidad del 100% de cultivos de *L. monocytogenes* sobre Ampicilina, Penicilina, Sulfametoxazole Trimetoprim, Gentamicina, Vancomicina, Rifampicina y Tetraciclina; 71% sobre Ciprofloxacino, 57% sobre Eritromicina, 29% sobre Cloranfenicol y 14% sobre Ácido Nalidixico llegando a la conclusión de que estos siete antibióticos mostraron efectividad en un 100% sobre *L. monocytogenes* y que además han permanecido relativamente estable con el paso de los años, aspecto que se ha evidenciado en este trabajo.
- **Gamboa M. y col 2012 (Colombia).** Aislaron y analizaron la susceptibilidad antimicrobiana de 259 aislados de especies de *Listeria monocytogenes* de plantas procesadoras de cerdos en Colombia, haciendo uso de la técnica de microdilución en caldo (MicroScan system). Las drogas de elección para el tratamiento de la listeriosis humana permanecieron efectivas. Es así que el 98,8% de cepas de *L. monocytogenes* fueron sensibles a Penicilina y Ampicilina; 96,5% a Trimetoprim-Sulfametoxazol; 93,4% a Vancomicina y 84,2% Eritromicina. Concluyeron además que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) fue de 0.5 µg/ml para Penicilina, Ampicilina y Trimetoprim-Sulfametoxazol, 2.0 µg/ml para Vancomicina y 8 µg/ml para Eritromicina. Sus estudios indican que estos antimicrobianos pueden ser administrados en casos de listeriosis humana.
- **Niño J., 2012 (Colombia).** Aisló y evaluó la resistencia antimicrobiana en cepas de *L. monocytogenes* aisladas de cortes de carne de origen porcino mediante la técnica de microdilución (sistema microScan

system). Obtuvo una incidencia de 33.3% de *L. monocytogenes*; con respecto al perfil antimicrobiano encontró aislamientos resistentes; 75,6% cepas resistentes a Clindamicina; 8,9% a Azitromicina; 8,9% a Eritromicina y 2,3% a Trimetoprim/ Sulfametoxazol y ninguna cepa resistente a Penicilina, Ampicilina Acido clavulánico, Meropenem, Rifampicina, Tetraciclina y Vancomicina. Mostró mediante éste estudio que lo aislamientos de *L. monocytogenes* provenientes de muestras de origen de carne porcino fueron sensibles a los antibióticos más comúnmente utilizados para tratar la listeriosis humana. Para el caso de Penicilina y Ampicilina la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) hallada fue de 0.5 µg/ml, por lo cual recomienda su uso.

- **Perez E. y col 2012 (El Salvador).** Aislaron cepas de *L. monocytogenes* a partir de 24 muestras de espinaca (*Spinacea oleracea*), para posteriormente determinar la resistencia microbiana de éstas cepas frente a tres germicidas utilizados en la desinfección de los alimentos a diferentes concentraciones: hipoclorito de sodio (1 y 2%), ácido láctico (1 y 2%) y ácido acético (4 y 5%) mediante el método de Kirby Bauer modificado, utilizando como referencia solución de yodo 2%. Identificaron *L. monocytogenes* en el 71% (17/24) de las muestras de espinaca, además dichas cepas presentaron mayor resistencia al hipoclorito de sodio (1 y 2%) y al ácido láctico (1%), mientras que frente al ácido acético (4 y 5%) no presentaron resistencia, por lo que este germicida es efectivo contra *L. monocytogenes*. Los resultados de éste estudio ponen de manifiesto que el aumento de la resistencia de ésta bacteria se debe al uso indiscriminado del germicida en hortalizas, ocasionando tolerancia de la bacteria.
- **Moura F. y col 2010 (Brazil).** Analizaron el perfil de susceptibilidad antimicrobiana de 68 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de humanos. Los exámenes de susceptibilidad se evaluaron usando el método de difusión en disco y E-test para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Concluyeron que las 68 cepas fueron susceptibles a Ampicilina, Rifampicina, Cefalotina, Eritromicina, Gentamicina,

Teicoplanina y Vancomicina. Para el caso de la Ampicilina se obtuvo una  $CMI_{90}$  de 1.0  $\mu\text{g/ml}$ , la Rifampicina una  $CMI_{90}$  de 0.25  $\mu\text{g/ml}$  indicando que tiene una actividad efectiva contra *L. monocytogenes*.

- **Rojas C. 2007 (Colombia).** Evaluó cuatro desinfectantes con principio activo a base de amonio cuaternario (200 y 400 ppm), alquín amín betaina (0,25 y 0,5% v/v), hipoclorito de sodio (500 y 250 ppm) y ácido láctico (1 y 2 % v/v) mediante la técnica de porcentaje de inhibición, sobre cepas de *L. monocytogenes* aisladas de productos cárnicos crudos de una planta procesadora de Bogotá. Realizó curvas de crecimiento de las cepas aisladas, para establecer la fase estacionaria y enfrentarlos con los desinfectantes. La cinética de crecimiento de cada una de las cepas de *L. monocytogenes* mostró que entra en fase estacionaria en la hora 12. Asimismo, en las condiciones de ensayo evaluadas obtuvo un porcentaje de inhibición del 100% con los desinfectantes con principio activo a base de amonio cuaternario (200 y 400 ppm), hipoclorito de sodio (500 ppm) y alquín amín betaina (0,5% v/v), con lo cual demostró su efectividad.
- **Balsalobre H. y col 2004 (España).** Investigaron la sensibilidad a diecinueve antibióticos en cepas de *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica* aisladas de diferentes alimentos de origen animal, utilizando la técnica de difusión en placa. Las cepas de *L. monocytogenes* fueron sensibles en un 100% a casi todos los antibióticos utilizados, con la excepción de una cepa resistente a Tetraciclina. Es así que *L. monocytogenes* fue sensible a Amikacina, Acido Nalidíxico, Amoxicilina-Clavulánico, Ampicilina, Cefalotina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Colistina, Eritromicina, Estreptomina, Gentamicina, Kanamicina, Nitrofurantoina, Penicilina, Ticarcilina, Tobramicina, Trimetoprin-Sulfametoxazol y Vancomicina. Por el contrario, en *Salmonella enterica* la presencia de resistencia es muy frecuente siendo muy común la multiresistencia.

- **Best M. y col 1989 (Canadá).** Evaluaron la eficacia de 14 desinfectantes sobre cepas de *L. monocytogenes* en presencia de materia orgánica haciendo uso de pruebas de eficacia cuantitativa. Muchos de los desinfectantes evaluados no fueron efectivos sobre las cepas cuando la bacteria estuvo en la superficie de los discos de acero (prueba del portador) o cuando fueron puestos en suspensión (prueba de suspensión). Concluyeron que 3 desinfectantes (Povidona yodada 1%, Gluconato de clorhexidina 4% y Glutaraldehído 2%) fueron efectivos en la superficies de los discos de acero, pero no fueron efectivos cuando fueron puestos en suspensión; demás 4 desinfectantes (Cloramina T 0.4%, Ácido fosfórico 0.45%, Yodoformo 0.008%, y Formaldehído 3.7%) fueron muy efectivas cuando fueron puestas en suspensión pero no en la prueba del portador. Estas cepas mostraron bastante resistencia frente al Etanol 70%, Hipoclorito de sodio 60 ug/ml, Dicloroisocianurato de sodio 60 ug/ml, Hipoclorito de sodio metilado 0.5%, Glutaraldehído fenato 0.125% Compuesto de amonio cuaternario 0.04% y 0.05%. Los resultados presentados generan mucha información en la selección del desinfectante apropiado para lugares y/o instalaciones de investigación, hospitales y plantas de productos lácteos y de alimentos.

## 1.2 HORTALIZAS

Las hortalizas se definen como "cualquier planta herbácea que se puede utilizar como alimento, ya sea en crudo o cocinada. La parte comestible está constituida por sus órganos verdes (hojas, tallos o inflorescencia), raíces, bulbos, frutos y semillas" (Aranceta B. y col., 2006).

En su composición, son ricas en fibra, vitaminas y minerales, pero con un contenido bajo de lípidos (menos del 1%) y proteínas (0.6-5%). El agua es el principal componente de las mismas, pues supone aproximadamente el 90% de su peso, seguida por los hidratos de carbono, mayormente polisacáridos. Este grupo de alimentos se destaca por su aporte de vitamina C y carotenos, que les concede una alta capacidad antioxidante (Aranceta B. y col., 2006).

**Tabla N° 1: Hortalizas de uso común**

Parte de la planta	Nombre vulgar	Nombre científico
Raíces	Zanahoria	<i>Daucus carota L.</i>
	Remolacha	<i>Beta vulgaris L.</i>
	Rábano	<i>Raphanus sativus var. Alba</i>
Bulbos	Cebolla	<i>Allium cepa L.</i>
	Ajo	<i>Allium sativum L.</i>
	Puerro	<i>Allium porrum L.</i>
Tallos	Esparrago	<i>Asparagus officinalis L.</i>
	Apio	<i>Apium graveolens L.</i>
Hojas	Acelga	<i>Beta vulgaris var. Cyclo L.</i>
	Espinaca	<i>Spinacia oleracea L.</i>
	Lechuga	<i>Lactuca sativa L.</i>
	Repollo	<i>Brassica rubra oleracea L.</i>
Flores	Coliflor	<i>Brassica oleracea L.</i>
	Alcachofa	<i>Cynara scolymus L.</i>
Frutos	Tomate	<i>Lycopersicon esculentum L.</i>
	Pepino	<i>Cucumis sativus L.</i>
	Pimiento	<i>Capsicum annuum L.</i>
Semillas	Guisante	<i>Pisum sativum L.</i>
	Maíz	<i>Zea mays L.</i>

Fuente: Torija I., 2002.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, en el 2003, recomienda el consumo de 400g por día y la Comisión del Codex Alimentarius, en el 2010, introdujo la campaña “cinco al día” en el que se promueve el consumo de al menos, 5 porciones de hortalizas cada día (Goodburn C. y col., 2012).

Globalmente, el consumo de hortalizas se ha incrementado aproximadamente en 4.5% entre los años de 1990 y 2004 por varias razones; una de las cuales, son los beneficios para la salud asociados con su consumo, que ha llevado a cambios alimenticios de los consumidores que están más conscientes e interesados en los beneficios a la salud y comer de la manera correcta y equilibrada, con menor proporción de carbohidratos, grasas y aceites y con una mayor participación de la fibra, vitaminas y minerales (Srey S. y col., 2013).

### 1.2.1 Hortalizas involucradas en brotes de ETAs

Un incremento gradual en la población y en los cambios de estilo de vida y dieta, así como los cambios en las prácticas agronómicas, cosecha, distribución, producción y consumo, han incrementado los brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) asociadas al consumo de hortalizas (Hung Y. y col., 2010). En el 2008, la FAO y OMS identificaron a las hortalizas como un grupo de alimentos de mayor preocupación en seguridad microbiológica (Issa Z. y col., 2011).

La composición de las hortalizas provee suficientes nutrientes y condiciones que hacen que sean ideales para el desarrollo de microorganismos deterioradores y patógenos, por lo que son asociados con infecciones microbianas. También pueden contaminarse en cualquier etapa del procesamiento debido a que se consumen de manera cruda y sin ningún tratamiento que garantice su inocuidad por lo que representan un alto riesgo para la salud (Pangloli P. y col., 2013).

En el 2003, Harrison J. y col, reportaron los microorganismos patógenos relacionados con enfermedades transmisibles por hortalizas. Estos microorganismos pueden ser categorizados como sigue:

- Microorganismos asociados al suelo: *L. monocytogenes*, *C.botulinum*.
- Microorganismos asociados a materia fecal: *Samonella spp.*, *Shigella spp.*, *E.coli* O157:H7.
- Parásitos patógenos: *Cryptosporidium*, *Cyclospora*.
- Virus patógenos: Hepatitis A, enterovirus, virus Norwalk.

Muchos de estos microorganismos patógenos pueden contaminar las hortalizas (vía humana o animal). El manejo de frutas y hortalizas por parte de trabajadores o consumidores infectados, contaminación cruzada, uso de agua contaminada, uso inadecuado de estiércol como fertilizante o el contacto con el suelo, puede ocurrir la contaminación de los alimentos (Bérmudez A. y col., 2013).

Este microorganismo entra a la cadena de procesamiento de las frutas y hortalizas desde la granja o debido al ambiente de procesamiento. Se encuentra presente en el tracto intestinal de los animales y humanos, y se

encuentra ampliamente distribuido en el suelo y en agua residuales y puede diseminarse en las granjas por la materia fecal de los animales, si este microorganismo llega a contaminar el ambiente de procesamiento, puede llegar a colonizar las superficies de los equipos, sobreviviendo en el suelo y paredes e incluso en hendiduras de los equipos formando biopelículas. Se encuentra ampliamente distribuido en frutas y hortalizas frescas, ha sido aislado en diferentes productos como en ensaladas, hojas de lechuga, pepino y frutas rebanadas, así como en tomate y melón. En 1981, una ensalada, siendo la col, el vehículo de *L. monocytogenes* fue asociado, causando un brote de listeriosis en Canadá. Sin embargo, la mayoría de los reportes de listeriosis son asociados al consumo de frutas y hortalizas frescas, como espárrago, brócoli, col y coliflor que son almacenados a 4°C (Lamikanra O., 2002).

### **1.3 LISTERIA**

Listeria es un género de bacterias Gram positivas que pueden encontrarse en el suelo, agua, alimentos y animales.

#### **1.3.1 Clasificación del género Listeria**

Actualmente, se considera que este género comprende ocho especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*, *L. marthii* y *L. rocourtiae*. Las dos últimas fueron descritas en 2010 (Graves L. y col., 2010), por lo que toda la literatura existente hasta ese año consideraba que el género Listeria estaba compuesto por 6 especies.

Muy recientemente, se ha propuesto la existencia de una especie nueva de Listeria, *L. weihenstephanensis* (Lang H.y col., 2013). De las 8 especies reconocidas actualmente, sólo *L. ivanovii* y *L. monocytogenes* son patógenas, considerándose a *L. ivanovii* como un patógeno animal y a *L. monocytogenes* como un patógeno animal y humano. (Fajardo O. y col., 2008).

### 1.3.2 *Listeria monocytogenes*

#### A. Posición taxonómica

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Firmicutes

**Clase:** Bacilli

**Orden:** Bacillales

**Familia:** Listeriaceae

**Género:** *Listeria*

**Especie:** *Listeria monocytogenes*

Fuente: (Garrity G., 2005)

*Listeria monocytogenes* fue descubierta por E.G.D. Murray en 1926, cuando estudiaba una epidemia que afectaba a conejos y cerdos de Guinea, en Inglaterra (Cossart P., 2007).

Esta bacteria tenía la capacidad de estimular la producción de monocitos en conejos produciéndoles monocitosis y por ello recibió el nombre de *Bacterium monocytogenes*. Poco después, se la denominó *Listeria monocytogenes*, en honor al cirujano inglés Joseph Lister (Pamer E., 2004).

En 1928, se estudiaron los primeros casos de infecciones en humanos y durante mucho tiempo, se la consideró como una bacteria zoonótica. Durante la segunda mitad del siglo XX, la listeriosis empezó a ser considerada como un agente de infección humana, explicada en parte por los cambios en la alimentación y por la introducción de terapias inmunosupresoras (Disson O. y col., 2012).

Desde 1980, pasó a considerarse como uno de los patógenos de transmisión alimentaria más virulentos, ya que el primer brote de listeriosis humana debido al consumo de comida contaminada ocasionó una alta tasa de mortalidad (Cossart P., 2007).

La principal razón por la que esta bacteria causa enfermedades severas es su capacidad para inducir su propia fagocitosis por las células animales, seguida por una rápida multiplicación y dispersión a otras células adyacentes. Los factores de virulencia que posee le permiten aprovecharse de las defensas del

hospedador, cruzar las barreras epiteliales y evadir el sistema inmunitario humoral (Remuzgo M., 2014).

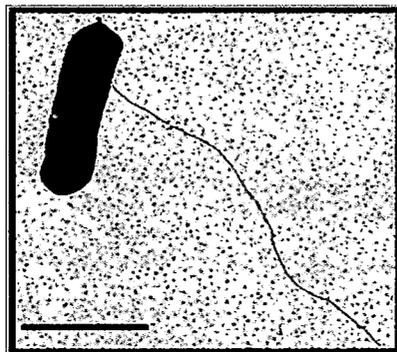
## B. Morfología

*L. monocytogenes* es un bacilo Gram positivo de pequeño tamaño (0,4-2,0  $\mu$ ), anaerobio facultativo, no esporulado y flagelado (de 1 a 5 flagelos) móvil a temperatura ambiente (25°C), pero inmóvil a 37°C (Lorber B., 2005).

Es catalasa positiva, oxidasa negativa, fermenta la glucosa y la lactosa, no ataca la xilosa ni el manitol, no produce H<sub>2</sub>S (Cecchini E. y col., 2008).

*L. monocytogenes* crece en medios de cultivo agar – sangre y produce  $\beta$ -hemólisis débil en placas de agar sangre de cordero (Murria P. y col., 2009)

**Figura N° 1: Microfotografía de microscopía electrónica de transmisión del bacilo *L. monocytogenes***



La figura muestra un único flagelo. Aumentos, 20 000X. La barra de escala indica 2  $\mu$ . Fuente: (Remuzgo M. y col., 2013).

*L. monocytogenes* se encuentra como unidades individuales, en pequeños grupos o en cadenas cortas, pudiendo estar dispuestas en forma de V o Y o en formas empalizadas. A veces, las bacterias tienen forma cocoide; con un promedio de 0.5  $\mu$  de diámetro; pudiendo ser confundidas con estreptococos (Rocourt J. y col., 2007).

La prueba de CAMP (Christie - Atkins- Munch- Peterson), es utilizada para la identificación de *L. monocytogenes*, el resultado será la presencia de hemólisis en forma de “punta de flecha” (Jay J. y col., 2002).

### **C. Movimiento**

Se creía que *L. monocytogenes* tenía los mismos mecanismos que el *Vibrio cholerae* que usa sus flagelos para nadar contra el movimiento peristáltico que sigue el contenido intestinal y penetra la mucosa del intestino, donde se adhiere. Curiosamente, a pesar de que *L. monocytogenes* a temperatura ambiente (20°C - 25°C), es activamente móvil; por sus flagelos peritricos; tiene un movimiento característico, basado en un lanzamiento rápido el cual se combina con salto y rotación (Todar K., 2012).

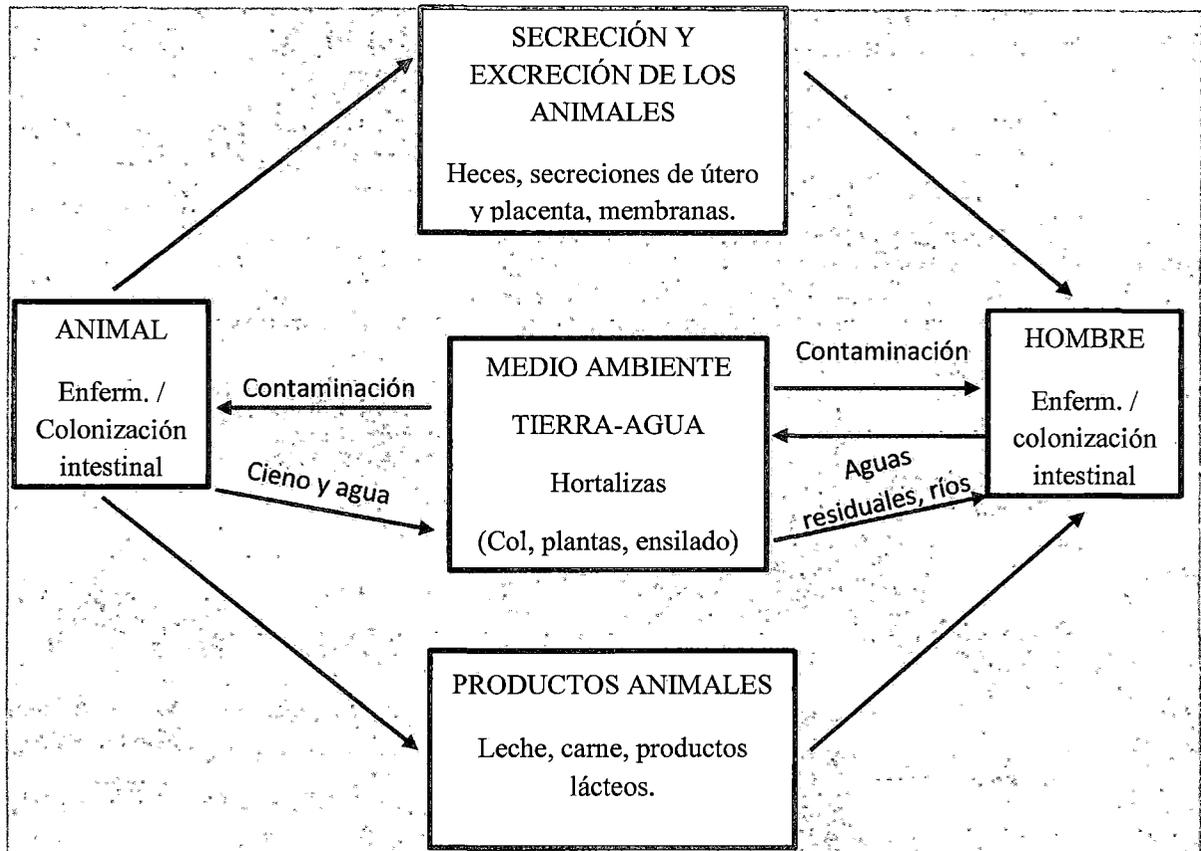
A la temperatura corporal de 37°C, estos microorganismos no sintetizan flagelos, reduciéndose el número total de flagelos a uno o dos los cuales están situados por lo general en la región polar de la bacteria. Por ello su virulencia está asociada a la capacidad de moverse hacia dentro de las células y entre las células del huésped, actividad que la realiza por medio de la polimerización de la actina; en un extremo de la bacteria denominándose a esta polimerización "colas crecientes de actina" las que ayudan a que pueda ser impulsada a través del citoplasma (Todar K., 2012).

### **D. Distribución**

Esta bacteria crece en un amplio rango de ecosistemas; se encuentra de forma ubicua en la naturaleza, tanto en el suelo como en la vegetación en descomposición, en agua fresca y en aguas residuales, también forman parte de la materia fecal de muchos mamíferos (Allen S. y col., 2008), sobre todo en los animales de granja como los rumiantes quienes pueden ser portadores sanos de *L. monocytogenes* y eliminar la bacteria en las heces (Norrung B. y col., 2009).

Esta bacteria es contaminante frecuente de plantas procesadoras de alimentos, llegando a contaminar las superficies que contactan con los alimentos; incluido el producto mismo; coloniza a los seres humanos y a diversas especies de animales, causando zoonosis (AESAN., 2011).

**Figura N°2: Modos mediante los cuales *L. monocytogenes* se disemina en el ambiente, en los animales, en los alimentos y en las personas.**



Fuente: (Audurier A. y col., 1989)

*L. monocytogenes* está muy difundida en la tierra, donde puede persistir durante mucho tiempo, por lo que los vegetales crudos son vehículos potenciales de listeriosis humana. Uno de los principales brotes relacionados con verduras, se dio en Canadá (1980), debido a una ensalada de coles, donde los coles habían sido conservadas en refrigeración por un periodo prolongado, factor que origino el crecimiento de *L. monocytogenes*. Dichos coles se habían cultivado en campos en los que habían pastado ovinos cuya materia fecal contamina la tierra con *L. monocytogenes* (ICMSF., 2001).

Esta bacteria patógena ha sido aislada de diversas hortalizas, tales como tomates, zanahorias, lechugas, repollos, espinacas, pepinos, judías, coliflores, brócolis, entre otras, en las cuales la contaminación es variable y se ve influenciada por el lugar de cultivo, la zona de recolección, los abonos, la

temperatura, los procedimientos de lavado, el contacto con el suelo y las condiciones higiénicas durante el expendio (Carrasco E., 2007).

### E. Condiciones de supervivencia

*L. monocytogenes* posee la capacidad de sobrevivir durante períodos prolongados en el ambiente (suelo, plantas y agua) y multiplicarse bajo ciertas condiciones (Allén S. y col., 2008).

**Tabla N°2: Factores que impactan en el crecimiento y la supervivencia de *L. monocytogenes***

Factor	Puede crecer			Sobrevive pero no crece
	Límite inferior	Óptimo	Límite superior	
Temperatura (C°)	-1.5 – 3.0	30.0 – 37.0	45.0	-18.0
pH	4.2 a 4.3	7.0	9.4 – 9.5	3.3 a 4.2
Actividad de agua (Aw)	0.90 a 0.93	0.99	> 0.99	< 0.90
Concentración de sal (%)	< 0.5	0.7	12 a 16	≥ 20

Fuente: AESAN, 2011

Puede sobrevivir en el interior de los productos alimenticios, pudiendo crecer en las biopelículas ubicadas sobre la superficie de distintos alimentos, que han permanecido durante largos períodos de tiempo en malas condiciones de almacenamiento (Murray P. y col., 2006).

*L. monocytogenes* tiene habilidad para adherirse a las superficies formando biopelículas de exopolisacáridos generándose así resistencia a los procesos de limpieza y desinfección. Ello facilita la contaminación no sólo de los alimentos sino de equipos y de utensilios en las plantas procesadoras (Pérez R. y col., 2008).

### 1.3.3 LISTERIOSIS HUMANA

#### A. Origen y transmisión de la listeriosis

*L. monocytogenes*, al tratarse de una bacteria ubicuitaria se puede encontrar en una amplia variedad de lugares. En el medio ambiente se puede hallar en suelos, vegetales, pastos, aguas dulces y marinas, lodos, en explotaciones ganaderas, e incluso en hogares, puede llegar a sobrevivir de 1-2 años en suelo. También se puede encontrar en animales y en el hombre, encontrándose en un 10-30% y de un 3-11 %, respectivamente, como portadores intestinales. Este porcentaje aumenta entre personal de laboratorio, trabajadores de mataderos y veterinarios clínicos. La tasa de estos “portadores sanos” contrasta con la baja frecuencia con que se detecta la enfermedad: 1 a 3 casos anuales por millón de habitantes (Gómez E., 1993).

La principal vía de transmisión de *L. monocytogenes* es la contaminación en el origen del alimento, mediante la ingestión de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* o bien mediante contacto directo nosocomial (poco frecuente) o con animales. Otras vías de relevancia son la contaminación cruzada a partir de superficies, instalaciones, equipos de corte, utensilios y manipuladores; a lo cual hay que sumar la dificultad de eliminar los biofilms y el cruce entre productos frescos y terminados.. Por último, otra de las vías de transmisión es la materno-fetal, ya que se ha comprobado que puede transmitirse a través de la placenta (Marco N., 2011).

#### B. Patogenia

Hoy en día se han identificado diversos determinantes moleculares de virulencia que juegan un papel muy importante en la infección celular por *L. monocytogenes*. Estos determinantes de virulencia comprenden, entre otros, las internalinas, la listeriolisina O (LLO), la proteína Act A y dos fosfolipasas,. A pesar de que existe polimorfismo entre diferentes cepas de *L. monocytogenes* respecto a algunos de estos determinantes de virulencia, este hecho no puede correlacionarse con la capacidad o la incapacidad del organismo para producir enfermedad (Torres y col., 2005).

### **C. Ciclo infectivo**

*L. monocytogenes* es intracelular facultativo que penetra en el hospedador a través del sistema digestivo. Una vez dentro del organismo lleva a cabo su ciclo infectivo en 4 etapas:

#### **- Entrada a la célula del hospedero**

La internalización se lleva a cabo por la formación de una vesícula fagosómica, en esta participan dos proteínas de superficie denominadas Internalina A e Internalina B, cada una provoca un mecanismo de internalización de *L. monocytogenes* diferente. La primera interviene en la adhesión e invasión de células epiteliales polarizadas como las intestinales. En esta vía una serie de proteínas juegan un rol importante para lograr un rearrreglo de los filamentos de actina, dando como resultado una modificación de la membrana para la internalización de *L. monocytogenes* en la célula. Mientras que en la vía de internalización mediada por las Internalinas B está basado en la interacción de estas con su receptor lo cual da lugar a una cascada de señales que producen la internalización de Listeria, esto se da en células epiteliales no polarizadas como los hepatocitos (Garza V. y col., 2012).

#### **-Escape del fagosoma y desarrollo intracelular**

Una vez internalizada, la bacteria es capaz de escapar del ambiente hostil del fagosoma gracias a la secreción de una proteína citolítica activa a bajo pH, la toxina Listeriolisina O (LLO) responsable de su capacidad de invasión y virulencia, ya que le permite escapar desde el fagosoma hacia el citoplasma. *L. monocytogenes* produce catalasa y superóxidodismutasa, dos enzimas que la protegen de la oxidación fagolisosómica. Como consecuencia de la lisis del fagosoma el microorganismo se libera al citosol en donde se multiplica en un tiempo de generación de 50 minutos (Garza V. y col., 2012).

### **-Desplazamiento intracitoplasmático**

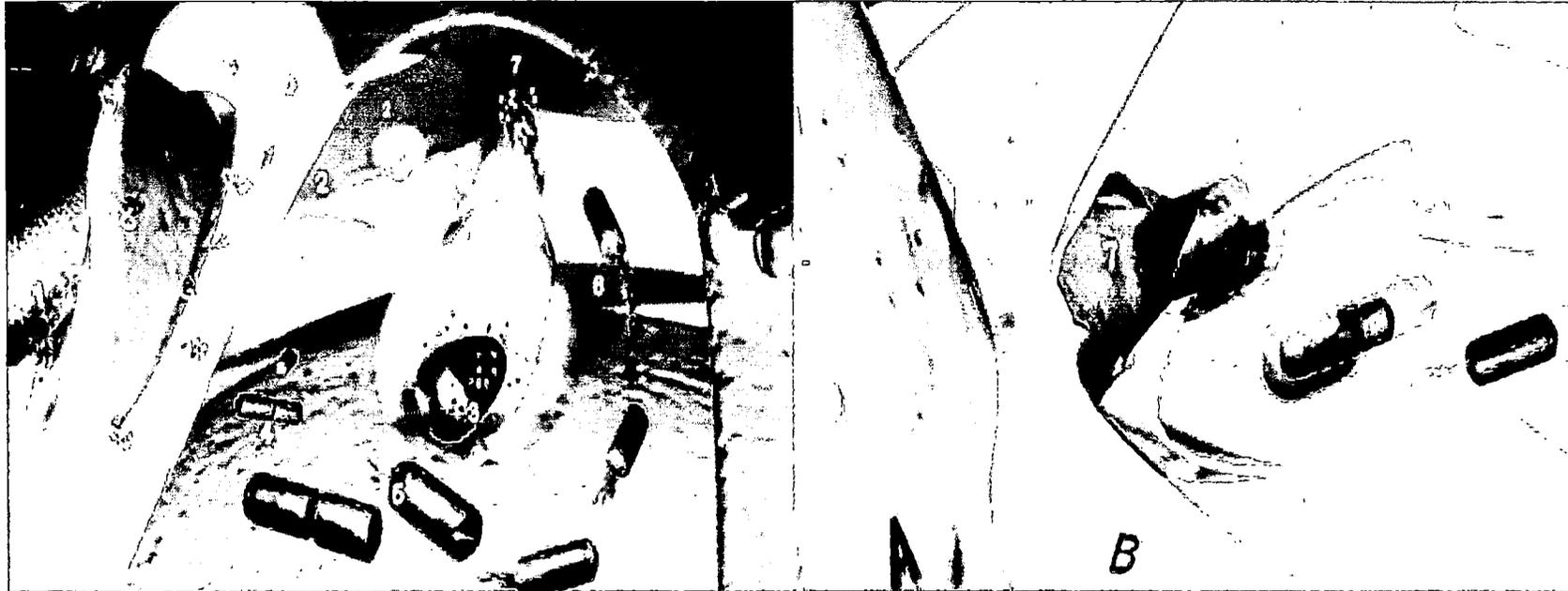
El movimiento intracelular tiene lugar como consecuencia de un ensamblaje direccional de monómeros de actina de la célula hospedera en uno de los polos de la bacteria, fenómeno dirigido por la proteína de superficie Act A (Actina A). De esta manera la morfología del microorganismo muestra estructuras (actínicas) semejantes a la cola de un cometa. Consecuentemente la polimerización de la actina aporta la fuerza locomotora para que *L. monocytogenes* transite en el ambiente intracelular a velocidades de 0.05 a 0.3  $\mu\text{m}/\text{seg}$  (Garza V. y col., 2012).

### **-Diseminación célula a célula**

La polimerización polar de actina propulsa a *L. monocytogenes* por el citoplasma en un movimiento aleatorio que hace que finalmente algunas bacterias alcancen la periferia de la célula infectada. Allí estas entran en contacto con la membrana celular, haciendo protusión hacia la célula colindante provocando que produzca prolongaciones alargadas filópodos o protusiones que contiene en su extremo una bacteria. Estas estructuras invasoras son fagocitadas y la bacteria queda encerrada en un fagosoma de doble membrana, del cual procederá a escapar y a repetir los eventos que protagonizó anteriormente. Al ser un mecanismo que permite la diseminación de la bacteria por los tejidos del hospedador sin entrar en contacto con los efectores humorales del sistema inmune, este fenómeno es crucial en la autogénesis de la infección por *L. monocytogenes* (Garza V. y col., 2012).

En la figura N°3 se observa paso a paso las etapas del ciclo intracelular de *L. monocytogenes*.

Figura N° 3: Etapas del ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*.



- 1) Internalización mediada por receptores.
- 2) Dentro de la célula, la bacteria es rodeada por una vacuola o membrana fagosomal.
- 3) Escape de la vacuola por la secreción de LLO y fosfolipasas.
- 4) Replicación en el citosol.
- 5) Polimerización de una red de filamentos de actina celular en uno de los polos de la bacteria.
- 6) Movimiento intracelular.
- 7) Invaginación de la membrana de la célula infectada (A) que permite la invasión bacteriana de la célula adyacente. Fuente: (Remuzgo M., 2014).

## D. Características clínicas

### a. Grupo de Riesgo

La enfermedad está limitada a varias poblaciones bien definidas cuya presentación dependerá del estado del hospedador donde los más susceptibles son los neonatos, los ancianos, las mujeres embarazadas y los pacientes con deficiencia en la inmunidad celular (Murray P. y col., 2006).

### b. Período de Incubación

El período de incubación para la enfermedad invasiva es generalmente entre 20 y 30 días, en personas adultas es de tres a 70 días, en bebés infectados el período de incubación es de una a cuatro semanas después del nacimiento (Torres K. y col., 2005).

### c. Signos clínicos

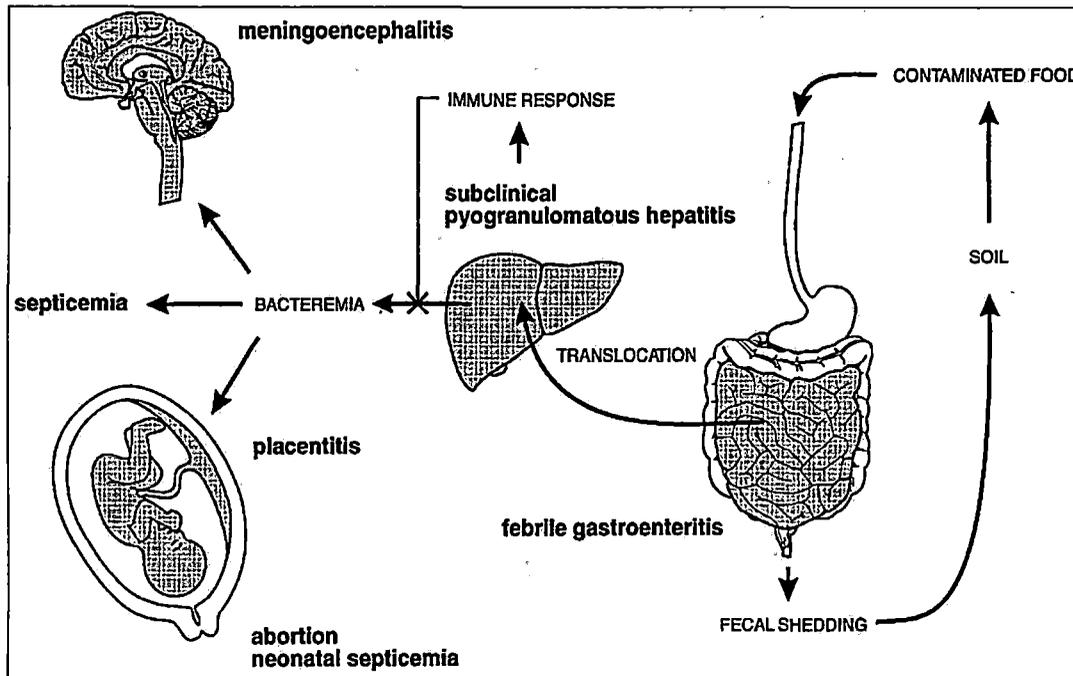
Los síntomas pueden ser ligeros, con una duración de pocas horas, semanas o meses (Bravo M., 2004).

**Tabla N° 3: Síntomas clínicos asociados con la infección por *L. monocytogenes*.**

Población	Cuadro clínico	Diagnóstico	Condición predisponente
<b>Mujeres embarazadas</b>	Fiebre, mialgia, diarrea, parto prematuro, aborto, muerte fetal, meningoencefalitis	Hemocultivo, cultivo de líquido amniótico	
<b>Recién nacidos &lt; 7 días de edad</b>	Sepsis, neumonía Meningitis, meningoencefalitis	Hemocultivo, cultivo de líquido cefalorraquídeo	Prematuro
<b>Adultos sanos</b>	Diarrea y fiebre	Cultivo en caldo de enriquecimiento selectivo	Posiblemente gran inoculo

Fuente: (Painter J. y col., 2007)

**Figura N°4: Representación esquemática de la fisiopatología de la infección por *Listeria monocytogenes*.**



Fuente: (Vázquez J. y col., 2001).

#### d. Mortalidad

La tasa de mortalidad de las infecciones sintomáticas por *Listeria* (20%-30%) es más alta que la de casi todas las restantes toxiinfecciones alimentarias (Murray P. y col., 2006).

El porcentaje de mortalidad por infecciones en el sistema nervioso central es alrededor del 20% pero pueden llegar a elevarse hasta un 40% a 60% si está asociado con enfermedades recurrentes que debilitan el sistema inmune (Torres K. y col., 2005).

#### e. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de la listeriosis se realiza mediante el cultivo de *L. monocytogenes* a partir de la sangre o del fluido cefaloraquídeo. También puede ser identificada en los alimentos por cultivo directo o por una variedad de métodos (Brock T. y col., 2003).

Estudios *in vitro* demuestran que *L. monocytogenes* es susceptible a un amplio rango de antibióticos como Penicilinas, Aminoglucósidos, Trimetoprima, Tetraciclina, Macrólidos y Vancomicina, la mayoría de ellos bacteriostáticos. Sin embargo presenta una resistencia natural a las cefalosporinas de tercera generación (Swaminathan B. y col., 2007).

El tratamiento de elección más efectivo para los casos de bacteremia, meningitis o abscesos por *L. monocytogenes* es la administración de Ampicilina o Penicilina (betalactámicos que interfieren en la síntesis de la pared celular de las bacterias). Entre ellos, se recomienda la Ampicilina ya que atraviesa mejor la BHE. Para que el efecto sea más rápido, al menos, durante los primeros días de tratamiento se aconseja administrar junto con un aminoglucósido, generalmente, Gentamicina (Moragas M. y col., 2010).

### **E. Epidemiología**

Aunque la listeriosis es una fracción muy pequeña de todas las ETAs conocidas, es una causa importante de enfermedad grave, que representan aproximadamente el 3.8% de las hospitalizaciones y el 27.6% de mortalidad (Painter J. y col., 2007) pudiendo alcanzar entre el 30% al 40% de las muertes por enfermedades transmitidas por los alimentos (Datta A., 2003).

Es una enfermedad esporádica que se ve durante todo el año, aunque su incidencia máxima ocurre en los meses más cálidos. Se ha calculado que cada año se producen alrededor de 2,500 infecciones, pero muchas de ellas son de carácter leve y por lo tanto no se registran (Murray P. y col., 2006). Debido a ello a pesar de que la infección asintomática es bastante rara, siempre se debe sospechar en el caso de huéspedes inmunodeprimidos. Existen casos esporádicos (fuera de los brotes de transmisión alimentaria) en tasas anualizadas de menos de un caso por 100,000 habitantes, aunque la infección es más frecuente en los lactantes (10 casos por cada 100,000 habitantes) y los ancianos (1.4 casos por cada 100,000 habitantes) (Allen S. y col., 2008).

La ingestión de *L. monocytogenes* a través de los diferentes alimentos puede ser habitual, aunque tras las regulaciones realizadas en la industria alimentaria su incidencia anual ha disminuido (4.4 casos por millón de habitantes

actualmente en los Estados Unidos). En España, probablemente por el mismo motivo, la incidencia ha disminuido de 10.95 casos a 2.4 casos por millón de habitantes de 1990 a 1992 (Aguado G. y col., 2006).

Dada la ubicuidad de la bacteria en los alimentos, es probable que los seres humanos tengan contacto diario con esta bacteria y ocurra una colonización transitoria en la mayoría de individuos; se estima que entre el 1 y el 5% de los individuos sanos son portadores y eliminan al patógeno en la materia fecal (Murray P. y col., 2006).

## **1.4 AGENTES GERMICIDAS**

Son sustancias que destruyen microorganismos (pero no esporas). Este tipo de compuestos reciben el nombre axiomático de bactericidas, fungicidas, virucidas, amebicidas, etc., según el tipo de microorganismo sobre el cual actúen. Los germicidas pueden ser antisépticos o desinfectantes (Betelgeux, 2013).

### **1.4.1 Antisépticos y Desinfectantes**

Los antisépticos son sustancias empleadas en tejidos vivos, que previenen o impiden el crecimiento o la acción de microorganismos por inhibición de su actividad o por la destrucción de ellos. Los desinfectantes son agentes antimicrobianos que se emplean solamente sobre objetos inanimados o medios inertes. Para la FDA (Food and Drug Administration) los desinfectantes son sustancias químicas capaces de destruir en 10 o 15 minutos los gérmenes depositados sobre el material inerte; deben alterar lo menos posible el sustrato donde actúan (Negróni M., 2009).

Factores que afectan la efectividad de antisépticos y desinfectantes

- El tipo de agente microbiano o infeccioso.
- El tiempo de contacto.
- La curva de muerte del agente infeccioso.
- La temperatura.
- La concentración.
- El pH.

- La formulación o el tipo de preparado.
- La interferencia de sustancias en el medio que actúan como barrera (Negroni M., 2009).

**Tabla N° 4: Clasificación de Antisépticos y Desinfectantes**

<p><b>I. Alcoholes</b></p> <p>Alcohol etílico Alcohol isopropílico.</p> <p><b>II. Aldehídos</b></p> <p>Formaldehído Glutaraldehído.</p> <p><b>III. Oxidantes</b></p> <p>Óxido de etileno Peróxido de hidrogeno Permanganato potásico</p> <p><b>IV. Biguanidas</b></p> <p>Clorhexidina</p> <p><b>V. Compuestos clorados</b></p> <p>Cloro y cloróforos Cloraminas Hipoclorito de sodio Oxícloroseno</p>	<p><b>VI. Compuestos yodados</b></p> <p>Tintura de yodo Yodóforos: povidona yodada</p> <p><b>VII. Fenoles</b></p> <p>Fenol Hexiresorcinol Parabenos Hexaclorofeno Triclosán</p> <p><b>VIII. Tensioactivos catiónicos</b></p> <p>Benzalconio Metilbencetonio</p> <p><b>IX. Compuestos de mercurio</b></p> <p>Mercurocromo Timerosal</p> <p><b>X. Compuestos de plata</b></p> <p>Nitrato de plata Sulfadiazina argéntica</p>
---	--

Fuente: (Florez J., 2008).

El objetivo de los agentes germicidas es disminuir el número de microorganismos, de forma que los que sobrevivan (algunas esporas y posiblemente unas pocas formas vegetativas muy resistentes) no influyan en la calidad microbiológica de las muestras y productos que contactan con las superficies desinfectantes (Arias J. 2006).

## **A. FORMALDEHIDO**

Conocidos comúnmente como formol, formalina y aldehído fórmico. El formaldehído es un gas incoloro, de olor irritante y lacrimógeno, soluble en agua y tiene un pH débilmente ácido. Se utiliza como desinfectante de alto nivel en estado líquido y gaseoso. Principalmente se utiliza en solución acuosa, en estas condiciones posee actividad bactericida, fungicida, virucida, tuberculicida y esporicida (Leveau J. y col., 2002). Su uso clínico es generalmente como desinfectante y esterilizante. Las concentraciones de formaldehído iguales o superiores al 5% constituyen un eficaz desinfectante líquido de uso muy extendido. Nivel de acción alto (Power E., 1995).

### **Mecanismo de acción**

El formaldehído actúa sobre las proteínas por desnaturalización, y sobre los ácidos nucleicos y las proteínas por alquilación. A nivel de los ácidos nucleicos la reacción es irreversible. El formol es un producto químico extremadamente reactivo y que interactúa con proteínas, ADN y ARN in vitro. Esto lo hace un producto esporicida, en virtud a su habilidad de penetrar dentro del interior de la espora de la bacteria (Power E., 1995).

### ***Ventajas***

- Bactericida-fungicida
- No corrosivo
- Buena enjuagabilidad
- Bajo costo.
- Activo en presencia de materia orgánica
- Necesita de 6 a 12 horas para eliminar bacterias y de 2 a 4 días para eliminar esporas, aún a altas concentraciones.

### ***Desventajas:***

- Olor desagradable
- Lacrimógeno

- Posibles riesgos tóxicos por inhalación.

- Irritante en forma de gas

(Leveau J. y col., 2002).

**Advertencia:** El formaldehído está considerado como probable carcinogénico (evidencias suficientes en animales, pero limitadas en seres humanos). (GTM., 2014).

## **B. HIPOCLORITO DE SODIO**

El hipoclorito de sodio es una solución clara de ligero color amarillento y un olor característico. Como agente blanqueante de uso doméstico normalmente contiene 5% de hipoclorito de sodio (con un pH alrededor de 11, es irritante). Si está a mayor concentración, contiene un 10 a 15% de hipoclorito de sodio (con un pH alrededor de 13, se quema y es corrosivo) (Lenntech., 2013).

El hipoclorito de sodio es de amplio espectro con actividad germicida contra virus, bacterias alcohol ácido resistentes y no ácidas, esporas, hongos, algas y protozoarios, al tiempo que presenta un riesgo ambiental mínimo. Sin embargo, la toxicidad del cloro para los microorganismos varía ampliamente, y depende de las condiciones del agua, la temperatura y las especies del organismo objetivo (King K., 2001).

Este agente germicida es relativamente inestable a la temperatura y a luz. Los derivados clorados, en forma de polvo, son más estables pero sensibles a la humedad. El cloro gaseoso, el hipoclorito de sodio y los derivados clorados dan ácido hipocloroso (HClO) en presencia de agua. (Leveau J. y col., 2002).

### **Mecanismo de acción.**

El mecanismo de acción sobre los microorganismos es poco conocido, pero se postula que actúan inhibiendo las reacciones enzimáticas y desnaturalizando las proteínas. Sin embargo se ha demostrado que el ácido hipocloroso (HClO) es el responsable de la destrucción de los microorganismos. Concretamente es la forma no disociada la que presenta mayor capacidad microbicida. Debido a que la disociación del ácido hipocloroso depende del pH (en pH ácido aumenta la forma no disociada) la eficacia del producto es mayor a pH ácido que a pH

básico (pese a ser más estable a pH básico). Se postula también que el mecanismo de acción se basa en la inhibición de reacciones enzimáticas claves por la acción oxidativa del cloro sobre los grupos SH de las enzimas. También contribuye a la inactivación la unión del cloro a algunos componentes de la pared bacteriana. Presenta un inicio de acción rápido pero no muy prolongado (Negroni M., 2009).

### ***Ventajas***

- Son eficaces contra una amplia variedad de bacterias, hongos y virus
- Bajo costo
- Se presentan en forma líquida o granulada
- Se puede añadir a agua de bebida.
- Buena enjuagabilidad.
- Actúa rápidamente
- No se origina subproductos tóxicos, baja toxicidad.

### ***Desventajas***

- Son inestables frente al calor
- Riesgos de corrosión
- Inactivo en presencia de materia orgánica
- Inactivado por la luz solar
- Inactivo en agua dura
- Se volatiliza rápidamente
- Inestabilidad ligada a la temperatura (Leveau I. y col., 2002).

**Advertencia:** El hipoclorito de sodio no figura en listados de cancerígenos, pero la solución acuosa de NaClO basa su riesgo en su poder corrosivo y sus propiedades irritantes derivadas de su alcalinidad (GTM., 2014).

## **C. ACIDO ACETICO**

El ácido acético conocido también como ácido etanóico, ácido etílico y ácido de vinagre, es un líquido incoloro transparente, con un fuerte olor característico y

de sabor marcadamente ácido. Una solución que contiene 4% P/V se conoce como vinagre artificial o condimento no fermentado. Es soluble en agua, alcohol y glicerina. El ácido acético por ser un ácido orgánico requiere de concentraciones altas para que sea efectiva al descontaminar diversos agentes. Este ácido ha sido investigado como un agente antimicrobiano (Vermeulen A. y col., 2007).

### **Mecanismo de acción**

Su uso como antiséptico se basa en su capacidad de proporcionar una acidificación al medio donde es aplicado, teniendo de este modo propiedades antibacterianas y antifúngicas. Su actividad depende de la concentración a la que se utilice (Vermeulen A. y col., 2007).

### **Espectro de actividad**

Antiséptico de nivel intermedio. Eficaz frente a bacterias Gram positivas y negativas. No es activo frente a virus ni micobacterias. Cierta actividad frente a protozoos y hongos (Vermeulen A. y col., 2007).

**Tabla N° 5: Espectro de actividad del ácido acético**

Gram positivos	Gram negativos	Micobacterias	Hongos	Protozoarios
++	++	-	+	+

Fuente: (Vermeulen A. y col., 2007).

Las soluciones de ácido acético deben guardarse en lugares fríos y en recipientes bien cerrados para que los gases no se evaporen (Vermeulen A. y col., 2007).

**Advertencia:** No está considerado como carcinógeno, sin embargo provoca efectos inmediatos en la salud como quemaduras, corrosión e irritaciones en los ojos, mucosas, piel y en el tracto respiratorio (GTM., 2014).

## **D. ÁCIDO CÍTRICO**

El ácido cítrico, ácido cítrico monohidratado, ácido de limón es un ácido orgánico. Se presenta en grandes prismas rómbicos, incoloros, translucidos,

inodoros y de sabor ácido. Ordinariamente se extrae del zumo de los limones. También se produce haciendo fermentar la glucosa o la maltosa por ciertos hongos (Llano T., 2007).

### **Mecanismo de acción**

La actividad antimicrobiana del ácido cítrico se debe a las moléculas no disociadas de este compuesto. Según la hipótesis más sostenida el ácido cítrico elimina a las bacterias por interferir con la permeabilidad de la membrana celular al producir un desacoplamiento en el transporte de sustratos y en la fosforilación oxidativa del sistema transportador de electrones. Este fenómeno da lugar a la acidificación del contenido celular, que es probablemente la principal causa de la inhibición de los microorganismos (Llano T., 2007).

### **Espectro de actividad**

Por su solubilidad, sabor y baja toxicidad, el ácido cítrico es muy utilizado como conservante bacteriostático de uso alimentario y regenerador de brillo en aceros inoxidable de uso en industrias alimentarias (Laboratorio López Valero, S.L, 2015).

**Advertencia:** Esta mezcla no está clasificada como peligrosa según la legislación de la Unión Europea (Merck., 2006).

## **E. TINTURA DE YODO**

La "tintura de yodo" ha sido usada, durante mucho tiempo como el mejor antiséptico cutáneo. Es una mezcla que contiene 2% de yodo más 2 % de yoduro potásico. Se usa diluido al menos diez veces su volumen en alcohol de 70° para evitar su efecto irritante. Su máximo efecto bactericida lo tiene a pH menor de 6. Tiene una acción muy rápida y bastante duradera, su concentración habitual de uso es entre 1% a 2% de yodo y yoduro de potasio en 70% de alcohol. En microbiología se utiliza ampliamente como solución de referencia para la aplicación del método de Kirby Bauer Modificado, por ser una sustancia de amplio espectro contra los microorganismos (Remington A., 2001).

### **Mecanismo de acción**

Su acción se produce por oxidación e inactivación de los componentes celulares. Es oxidante, precipitante de proteínas bacterianas y ácidos nucleicos. Altera las membranas celulares al unirse a los C=C de los ácidos grasos, todo ello le permite que sea muy activo contra todos los microorganismos (Arevalo J., y col., 2010).

### **Espectro de actividad**

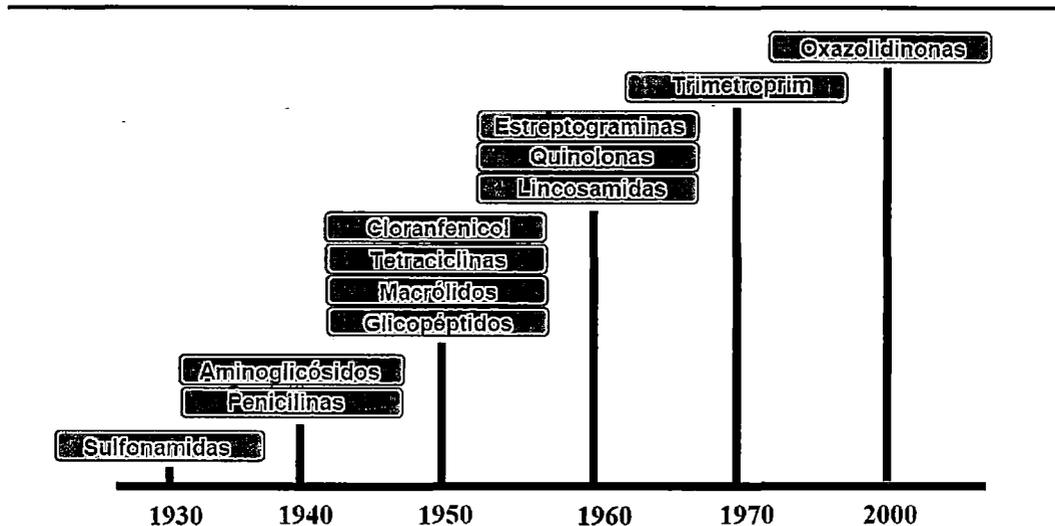
Tiene un amplio espectro de acción, incluyendo bacterias Gram positivas, Gram negativas, hongos, micobacterias, virus e incluso esporas (Arevalo J., y col., 2010).

## **1.5 ANTIBIOTICOS**

El término antibiótico deriva de la palabra antibiosis creada en 1889 por Jean Paul Vuillemin en su trabajo "Symbiose et Antibiose" y literalmente significa contra la vida. En 1942 Waksman, definió el término como aquella sustancia que generada por un microorganismo tiene la capacidad de inhibir el crecimiento e incluso destruir a otros microorganismos. Posteriormente la definición se extendió para incluir cualquier sustancia producida por un organismo vivo que, en bajas concentraciones, fuera capaz de inhibir el crecimiento o anular la vida de una o más especies microbianas. En la actualidad en el término se incluyen no solo las sustancias naturales, sino también los derivados semisintéticos y los quimioterápicos que se obtienen por síntesis química. (Moellering R., 2003).

A modo de resumen, en la Figura N°5 se puede ver una representación de las fechas aproximadas de la utilización práctica de diversos grupos de antibióticos.

**Figura N° 5: Fecha de introducción de diferentes antibióticos en la práctica clínica.**



Fuente: (Sjölund M., 2008).

### 1.5.1 Clasificación de los Antibióticos

#### A. Por su efecto antimicrobiano

- Bacteriostáticos.
- Bactericidas.

#### B. Por su espectro de actividad

- Amplio espectro.
- Espectro reducido.

#### C. Por su estructura química, se agrupan en familias con propiedades generales similares

- Betalactámicos.
- Tetraciclinas.
- Quinolonas.
- Aminoglucósidos.
- Glucopéptidos .
- Macrolidos, etc.

#### D. Por su mecanismo de acción

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- Alteración de la función de la membrana.

- Inhibición de la síntesis de proteínas.
  - Inhibición de la síntesis o función de los ácidos nucleicos.
- (García J. y col., 1999).

**Tabla N° 6: Clasificación de los antibióticos según su modo de acción.**

Grupo antimicrobiano	Ejemplos	Diana molecular
<i>Inhibidores de la pared celular</i>		
β-lactámicos	Penicilinas	Proteínas de unión a penicilina
	Cefalosporinas	
	Carbapenémicos	
	Monobactámicos	Aztreonam
	Glicopéptidos	Vancomicina
Fosfonatos	Fosfomicina	enolpiruvato-transferasa
<i>Inhibidores de la síntesis proteica</i>		
Aminoglicósidos	Gentamicina Estreptomina Kanamicina	Subunidad ribosomal 30S
Tetraciclinas	Doxiciclina	Subunidad ribosomal 30S
Macrólidos	Eritromicina	Subunidad ribosomal 50S
Lincosamidas	Clindamicina	Subunidad ribosomal 50S
Cloranfenicol	Cloranfenicol	Subunidad ribosomal 50S
<i>Inhibidores de los ácidos nucleicos</i>		
Sulfonamidas	Sulfonamida	Síntesis de ácido fólico
Trimetoprima	Trimetoprima	Síntesis de ácido fólico
Quinolonas	Ciprofloxacino	ADN girasa, topoisomerasas
Rifampicinas	Rifampicina	ARN polimerasa
<i>Antibióticos que afectan a la integridad de la membrana</i>		
Polimixinas	Polimixina E	Membrana celular

Fuente: (Edwards D., 1980)

## **1.5.2 Mecanismo de acción**

Los antibióticos se agrupan en función a su blanco de acción. Algunos actúan sobre la síntesis de la membrana o pared celular, otros sobre el ADN (replicación), la transcripción, la biosíntesis de proteínas o sobre el metabolismo (Martinez J. y col., 2007).

### **1.5.2.1 Inhibición de la síntesis de la Pared celular:**

Todas las células de los mamíferos como las bacterias, tienen membranas celulares necesarias para su integridad funcional, pero las bacterias tienen además de la membrana celular una pared celular externa rígida de la que carecen las células de los mamíferos. La lesión de la pared celular o la inhibición de su formación pueden conducir a la lisis de la célula. El anillo  $\beta$ -lactámico de la Penicilina hace que la pared celular pierda su acción de contenedor lo que permite la lisis de la bacteria. En bacterias Gram positivas, la pared es accesible, por el contrario en bacterias Gram negativas la pared se encuentra entre dos membranas y no hay tal accesibilidad, por lo que ha sido necesario producir por síntesis química nuevos preparados capaces de ejercer su acción (Martinez J. y col., 2007).

### **1.5.2.2 Alteración de la función de la Membrana celular**

La membrana celular es una barrera selectiva que mantiene la composición interna de la célula. Si la integridad funcional de la membrana se altera, los iones y macromoléculas se escapan y la célula se lesiona y muere (Martinez J. y col., 2007).

### **1.5.2.3 Inhibición de la síntesis de proteínas**

La síntesis de las proteínas tiene lugar gracias a la traducción de la información genética codificada en el ARNm. Los ribosomas o unidades funcionales de la síntesis proteica de las bacterias y de los mamíferos no se dividen en las mismas subunidades, diferencia que explica por qué los fármacos antimicrobianos inhiben los ribosomas bacterianos sin tener efecto en las células de los mamíferos. En general, los antimicrobianos que inhiben la

síntesis proteica tienen efecto bacteriostático, excepto los aminoglucosidos que son bactericidas (Martínez J. y col., 2007).

#### **1.5.2.4 Inhibición de la síntesis o función de los Ácidos nucleicos**

De tres formas:

- Interfiriendo la replicación del ADN. (Quinolonas)
- Impidiendo la transcripción. (Rifampicina, Actinomicina).
- Inhibiendo la síntesis de los metabolitos esenciales. (Sulfamidas, Timetropin) (Martínez J. y col., 2007).

### **1.6 Método de Kirby Bauer modificado**

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer, Kirby, este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el NCCLS (National Committee for clinical Laboratory Standars) de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos (NCCLS, 2000).

Este método consiste en medir el halo de inhibición producido por un desinfectante o un antiséptico preparado a una concentración determinada, al difundirse sobre la superficie del medio sólido cubierta con el microorganismo de prueba y compararlo con el halo de inhibición producido por una solución de Yodo. Generalmente se utiliza una solución de referencia con efectividad conocida para establecer una comparación con las sustancias de prueba, una de las más utilizadas es el yodo al 2% debido a su amplio espectro contra microorganismos tales como bacterias, hongos y protozoarios. Así, este método permite determinar la Concentración Inhibitoria Mínima del desinfectante en estudio al verificar que el halo de inhibición producido por el desinfectante sea mayor al halo de inhibición producido por la solución de Yodo (Toledo M. y col., 2001).

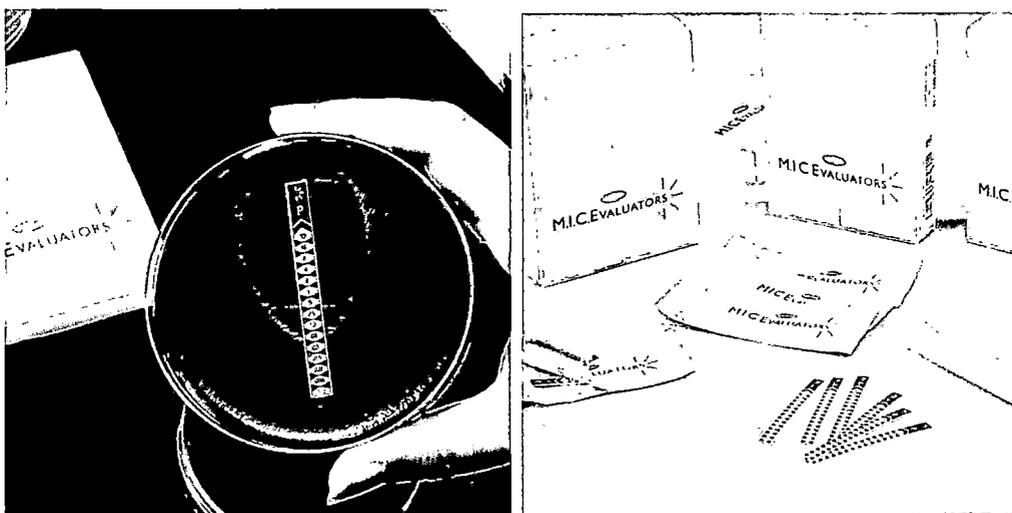
## 1.7 Método M.I.C.E (Minimum Inhibitory Concentration Evaluators)

El M.I.C.E (Minimum Inhibitory Concentration Evaluators), es un sistema para determinar cuantitativamente la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de un antibiótico frente a un microorganismo problema. El M.I.C.E proporciona un gradiente de antibióticos estabilizada en una tira de plástico con 30 graduaciones, para dar una CMI en el intervalo de 0,015  $\mu\text{g/ml}$  - 256  $\mu\text{g/ml}$  (también se dispone de tiras especiales para niveles bajos y altos). Estas tiras M.I.C.Evaluator son producidas por Thermo Fisher Scientific (Basingstoke, Reino Unido) (Oxoid, 2010).

Ventajas:

- Valores exactos de la CMI.
- El gradiente de antibiótico proporciona un excelente contraste con el agar.
- El aumento del tamaño de la fuente hace que la lectura sea más fácil y rápida.
- La escala conforma los estándares internacionales.
- Fácil de manejar.
- Adaptado a cumplir con los requisitos clínicos (Oxoid, 2010)

Figura N° 6: Forma de actuación de las tiras M.I.C.E



Fuente: (Oxoid, 2010).

## 1.8 PERFIL BIOQUÍMICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LISTERIA

### 1.8.1 Sistema Miniaturizado API Listeria

La galería API es un sistema estandarizado y miniaturizado para la identificación de especies del género *Listeria* que utiliza ensayos miniaturizados, así como una base de datos específica. El sistema consta de 10 microtubos que contienen los sustratos deshidratados y permiten la realización de ensayos enzimáticos o de fermentación de azúcares.

Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos.

**Tabla N°7: Tabla de identificación API Listeria**

Tests	Componentes activos	Cantidad (mg/cúp.)	Reacciones	Resultados	
				Negativo	Positivo
<b>DIM</b>	Sustrato enzimático	0,106	Diferenciación <i>L. innocua</i> / <i>L. monocytogenes</i>	ZYM B /< 3 min Naranja pálido Rosa beige Gris beige	ZYM B /< 3 min Naranja
<b>ESC</b>	Esculina citrato férrico	0,16 0,024	Hidrólisis (Esculina)	Amarillo pálido	Negro
<b>αMAN</b>	4-nitrofenil-αDmanopiranosida	0,045	A- MANosidasa	Incoloro	Amarillo
<b>DARL</b>	D- Arabinol	0,4	Acidificación (D-Arabinol)	Rojo/ rojo anaranjado	Amarillo/ amarillo anaranjado
<b>XYL</b>	D-Xilosa	0,4	Acidificación ( Xilosa)		
<b>RHA</b>	L-Rhamnosa	0,4	Acidificación(RHAMnosa)		
<b>MDG</b>	Metil-αDglucopiranosido	0,4	Acidificación (Metil-αDGLucopiranosido)		
<b>RIB</b>	D-Ribosa	0,4	Acidificación (RIBosa)		
<b>G1P</b>	Glucosa-1 Fosfato	0,4	Acidificación (Glucosa-1-Fosfato)		
<b>TAG</b>	D-Tagatosa	0,4	Acidificación (TAGatosa)		

Fuente: (BIOMÉRIEUX SA., 2010).

La lectura de estas reacciones se realiza con la ayuda de la Tabla de Identificación y la interpretación se realiza tras consultar la lista de perfiles de la ficha técnica o con la ayuda de un software de identificación. La composición de la galería API Listeria está conformada por: Galería API Listeria, Ampollas de suspensión medium (agua desmineralizada), ampolla de Reactivo ZYM, cámaras de incubación, hoja de resultados y ficha técnica. Este sistema API Listeria es producida por Oxoid, Biomérieux SA, Francia (Biomérieux SA., 2010).

## CAPITULO II

### MATERIALES Y METODOS

#### 2.1 AREA DE ESTUDIO

Para la presente investigación, las muestras de hortalizas se obtuvieron en cinco mercados principales de la Ciudad del Cusco: Central de San Pedro, Rosaspata, Ttío, Wanchaq y Vinocanchón. El trabajo de investigación se llevó a cabo durante los meses de Diciembre 2014 a Julio 2015.

#### 2.2 MATERIALES

##### 2.2.1 Muestra

- 100 muestras de hortalizas obtenidas en cinco mercados: 20 de lechuga, 20 de espinaca, 20 de tomate, 20 de zanahoria y 20 de rabanito.

##### 2.2.2 Cepas de ensayo

- Cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

##### 2.2.3 Material de Muestreo

- Cámara fotográfica digital LUMIX DMC-FS12
- Bolsas de polipropileno estériles
- Cooler
- Libreta de campo

##### 2.2.4 Medios de Cultivo

- Agar Oxford base (Scharlau, Union Europea)
- Agar selectivo PALCAM Listeria (Base) según VAN NETTEN (Merck, Alemania)
- Agar CASO (Merck, Alemania)
- Agar Nutritivo (Merck, Alemania)
- Agar Hierro tres azucares (Merck, Alemania)
- Agar Mueller Hinton (Merck, Alemania)
- Agar MIO (Merck, Alemania)
- Agar Sangre Base (Merck, Alemania)

- Caldo de Enriquecimiento selectivo para Listeria según Fraser (base) (Merck, Alemania)
- Caldo UREA (Merck, Alemania)
- Caldo Tripticasa-Soya (Merck, Alemania)
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (Merck, Alemania)
- Extracto de levadura granulada (Merck, Alemania)
- Suplemento Selectivo para Listeria según Fraser (Merck, Alemania).

### **2.2.5 Evaluadores de la Concentración Mínima Inhibitoria (M.I.C.E)**

- Ampicillin 256 M.I.C.E (Oxoid, United Kingdom)
- Penicillin 256 M.I.C.E (Oxoid, United Kingdom)
- Erythromycin 256 M.I.C.E (Oxoid, United Kingdom)
- Gentamicin 256 M.I.C.E (Oxoid, United Kingdom)
- Vancomycin 256 M.I.C.E (Oxoid, United Kingdom)

### **2.2.6 Agentes Germicidas**

- Hipoclorito de sodio 4% (Clorox, Perú)
- Ácido acético 50% (DIAGTEST, Perú)
- Ácido cítrico 100%(Merck, Alemania)
- Formaldehido 37% (Merck, Alemania)
- Tintura de Yodo 2% (Portugal, Perú)

### **2.2.7 Reactivos**

- Reactivo de Kovacs (Merck, Alemania)
- Peróxido de Hidrogeno 30% (Merck, Alemania)
- Sistema de identificación API Listeria (bioMérieux, Francia)
- Mac Farland standard (bioMérieux, Francia)
- D-Glucosa (Riedel-de Haen)
- Batería de coloración Gram
  - Solución cristal violeta
  - Solución yodo
  - Solución alcohol acetona
  - Solución safranina.

### **2.2.8 Equipos**

- Balanza digital (Kessel S.A)
- Vortex (Kessel S.A)
- Destilador (Ivimen)
- Contador de colonias (KENKO)
- Espectrofotómetro (PG Instruments)
- Incubadora (Kessel S.A)
- Refrigeradora (BOSCH)
- Horno Pasteur (Mettler)
- Autoclave (Phoenix)
- Microscopio Óptico (Leica)

### **2.2.9 Materiales de Vidrio**

- Tubos de ensayo con tapa rosca de 10 a 15 ml
- Matraces Erlenmeyer de 500 a 250 ml
- Placas Petri
- Probetas 100 ml
- Pipetas Pasteur 0,1; 5 y 10 ml
- Frascos de dilución 250 ml
- Vasos de precipitación
- Láminas porta objetos

### **2.2.10 Otros Materiales**

- Mechero Bunsen
- Gradilla metálica
- Hisopos estériles
- Pro pipeta
- Micropipeta de 10-100  $\mu$ L
- Puntas para micropipetas
- Vernier
- Asa y aguja de siembra
- Algodón
- Pabilo
- Plumón marcador

- Cinta maskin
- Papel craft
- Papel aluminio
- Tijera
- Pinzas
- Pinzas estériles
- Cilindros de acero inoxidable estériles
- Guantes
- Mascarillas

## 2.3 METODOLOGIA

### 2.3.1 MUESTREO Y TOMA DE MUESTRA

Para la recolección de las muestras de hortalizas se realizó el muestreo aleatorio simple, debido a que todas las muestras tienen la misma posibilidad de ser seleccionadas (tabla N° 8).

Para el muestreo y toma de muestra se utilizó la metodología descrita por Hitchins A., 2008. Las muestras de hortalizas se colectaron asépticamente en bolsas de polipropileno estériles, se rotularon correctamente e inmediatamente se las trasladó en un cooler al Laboratorio de Control de Calidad de Aguas y Alimentos en el pabellón de Control de Calidad de la Facultad de Ciencias, UNSAAC. El muestreo se llevó a cabo durante los meses de Diciembre 2014 a Enero 2015.

**Tabla N° 8: Mercados y hortalizas muestreadas**

Mercados	Hortalizas					
	Lechuga	Espinaca	Tomate	Zanahoria	Rabanito	TOTAL
San Pedro	4	4	4	4	4	20
Rosaspata	4	4	4	4	4	20
Ttío	4	4	4	4	4	20
Wanchaq	4	4	4	4	4	20
Vinocanchón	4	4	4	4	4	20
<b>TOTAL</b>	20	20	20	20	20	<b>100</b>

Fuente: Elaboración propia

### **2.3.2 Aislamiento de *Listeria spp.***

El procesamiento de las muestras de hortalizas se realizó siguiendo las técnicas descritas en el Bacteriological Analytical Manual de la Food and Drug Administration (Hitchins A., 2008), como se describe a continuación:

#### **Pre- enriquecimiento**

- Se pesó asépticamente 25 gr por cada muestra obtenidas.
- Se colocó la muestra en frasco conteniendo 225 ml de Caldo de Enriquecimiento selectivo para *Listeria* según Fraser (base).
- Seguidamente se homogenizó durante 1 minuto
- Se procedió a incubar a 37°C por 4 horas

#### **Enriquecimiento**

- Se adicionó 0.9 ml de suplemento selectivo para *Listeria* según Fraser, a cada muestra pre-enriquecida.
- Se continuó con incubación a 37 °C hasta completar a 48 horas.

#### **Aislamiento**

- Se sembró un inóculo a partir del caldo enriquecido anterior en placas con agar Oxford y Palcam mediante la técnica de estría en cuatro cuadrantes.
- Posteriormente se incubó a 37 °C por 24-48 horas
- Se aisló las colonias compatibles con el género *Listeria*.
- En el agar Oxford, la presencia de colonias pequeñas, redondas, color gris azulado rodeadas de un halo negro y con una depresión central se considera compatibles con el género *Listeria*; en agar Palcam, la presencia de colonias pequeñas, redondas, color verde grisáceo rodeadas de un halo marrón- negro, se consideran compatibles con el género *Listeria*.
- Finalmente se repicó en agar CASO- extracto de levadura 0.6% y en caldo Tripticasa Soya- extracto de levadura 0.6%. (Anexo N°1).

### 2.3.3 Identificación de *Listeria monocytogenes*

#### 2.3.3.1 Perfil bioquímico convencional

- Se realizó las pruebas de identificación convencionales: Coloración Gram, ureasa, Indol, TSI, catalasa, movilidad a 25 °C, prueba de CAMP (Koneman E. y col., 2008).

##### **Tinción de Gram:**

- En un portaobjetos se preparó un frotis de la muestra a observar y se fijó a llama directa.
- Se cubrió el frotis con cristal violeta y se dejó reaccionar por 1 min. Se quitó el exceso de colorante y se lavó con agua corriente.
- En seguida se aplicó la lugol, se dejó reaccionar por 1 min y se lavó con agua corriente. Con cuidado se agregó alcohol acetona, gota a gota con el portaobjetos inclinado, se lavó con agua corriente.
- Se cubrió el frotis con la solución de safranina y se dejó reaccionar por 30 segundos, se lavó el exceso de colorante y se dejó secar al aire.
- Se observó al microscopio (INCB, 2002).

##### **Prueba de catalasa:**

- Se recogió con un asa de inoculación el centro de una colonia obtenida de un cultivo puro. Se colocó sobre un portaobjetos, se agregó una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% sobre el cultivo y se verificó la generación de burbujas. Se seleccionó como positiva la presencia de burbujas (INCB, 2002).

##### **Prueba de Ureasa:**

- Se tomó una colonia típica de las placas con CASO-extracto de levadura (0.6%) y se inoculó en tubo conteniendo caldo Urea.
- Se incubó a 37°C/24 horas.
- La aparición de una coloración roja se denota como positivo y la coloración amarilla demuestra un resultado negativo (FDA-CFSAN, 2002).

#### **Prueba de Indol:**

- Se tomó una colonia típica de las placas con CASO-extracto de levadura y se inoculó en un tubo que contenía MIO.
- Se incubó a 37°C/24 horas
- Se agregó 3 gotas del reactivo de Kovacs
- La aparición de un anillo de coloración roja se denota como resultado positivo y un anillo de coloración amarilla demuestra un resultado negativo (FDA-CFSAN, 2002).

#### **Prueba de TSI:**

- Se tomó una colonia típica de las placas con CASO-extracto de levadura (0.6%) y se inoculó en tubos conteniendo TSI
- Se incubó a 37°C/ 24 horas (FDA-CFSAN, 2002).

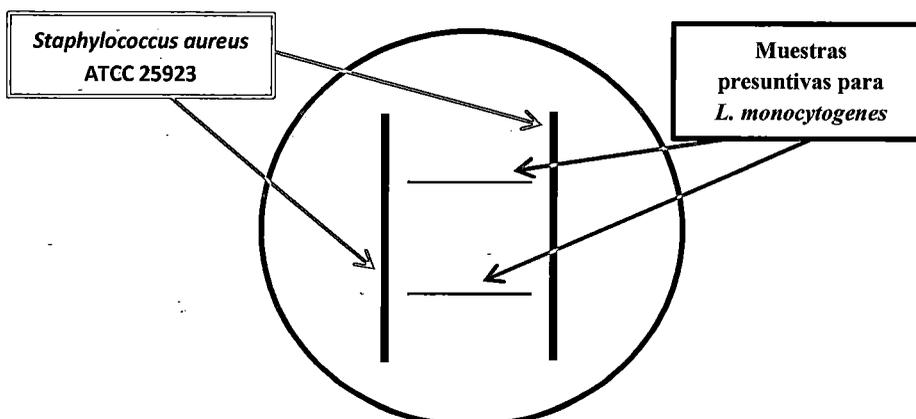
#### **Prueba de Movilidad:**

- Se tomó una colonia típica de las placas con CASO-extracto de levadura (0.6%) y se inoculó por puntura en un tubo que contenía el medio MIO.
- Se incubó por 7 días a temperatura ambiente.
- Se observó diariamente la movilidad de la bacteria (FDA-CFSAN, 2002).

#### **Prueba de CAMP:**

- Se sembró dos estrías de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en paralelo y diametralmente opuesto el uno del otro en placas de agar sangre.
- Seguidamente se sembró una estría de la muestra presuntiva de forma horizontal entre las estrías paralelas de *Staphylococcus aureus*.
- Se incubó a 37°C/24 horas.
- El sinergismo se observa como una área de hemólisis en forma de "punta de flecha" en la zona de desarrollo más cercana a ambas estrías (FDA-CFSAN., 2002). (Anexo N°2)

**Figura N°7: Forma de realización de la prueba de CAMP**



Fuente: (Jay J. y col., 2002).

### 2.3.3.2 Perfil bioquímico comercial

#### **Sistema Miniaturizado API Listeria**

Para la identificación definitiva de las cepas presuntivas para *Listeria monocytogenes*, se utilizó el sistema API Listeria. El llenado de los microtubos, adición del inóculo, incubación, lectura e interpretación de las pruebas se realizó de acuerdo con la metodología descrita previamente en la ficha técnica incluida en el Sistema Miniaturizado API Listeria (BioMérieux, Francia) que se describe a continuación.

#### **Selección de las colonias**

- Se verificó que la cepa a estudiar pertenezca al género *Listeria* (bacilos cortos, Gram positivos, polimorfo, móvil a 25° C pero no a 37° C, catalasa positiva, CAMP positiva).
- Dado que las muestras contienen con frecuencia una mezcla de varias especies de *Listeria*, resultó preferible realizar un subcultivo sobre agar con sangre a partir de una colonia bien aislada.
- Se incubó la placa a 24 h a 36° C.

#### **Preparación de la galería**

- Se reunió fondo y tapa de un cámara de incubación y se repartió aproximadamente 3 mL de agua destilada o desmineralizada (o

cualquier agua sin aditivos ni derivados susceptibles a liberar gases (Ej: Cl<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> ...) en los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda.

- Se escribió la referencia o la identificación de las muestras o cepas en la lengüeta lateral de la cámara
- Se extrajo una galería de su envase individual.
- Se colocó la galería en la cámara de incubación.
- Se eliminó la bolsita antihumedad

### **Preparación del inóculo**

- De manera cuidadosa se abrió una ampolla de API Suspensión Medium (2 mL) como indica en el punto la ayuda de una pipeta o PSlpette, se cogió colonias bien aisladas. Se usaron cultivos jóvenes (24 h).
- Se realizó una suspensión de turbidez igual a 1 de McFarland. Esta suspensión se utilizó de inmediato. Se observó el tipo de hemólisis y de inmediato se anotó en la hoja de resultados, ya que esta característica constituyó un ensayo adicional al API pero de gran importancia.

### **Inoculación de la galería**

- Se repartió la suspensión bacteriana precedente, en los tubos evitando la formación de burbujas (para ello se inclinó la cámara de incubación hacia delante y se colocó la pipeta en un lado de la cúpula).
- Se llenó el tubo y la cúpula del ensayo DIM (100 µL aprox.) cuidando que no se produzca un menisco convexo.
- Se llenó solamente la parte del tubo de los ensayos ESC a TAG (50 µL aprox.).
- La calidad del llenado fue muy importante ya que los tubos con excesiva o insuficientemente llenos originan resultados falsos positivos o negativos.
- Se cerró la cámara de inmediato.
- Se incubó de 24 horas a 36° C en atmósfera aerobia.

### **Lectura**

- Se agregó una gota de reactivo ZYM al ensayo DIM.

- Pasados 3 minutos se leyeron todas las reacciones haciendo referencia a la Tabla de identificación de la ficha técnica.
- Se anotaron las reacciones +/- en la hoja de resultados. (Anexo N°4).

#### **2.3.4 Cinética de Crecimiento**

Se realizó la curva de crecimiento de cepas de *L. monocytogenes*, con el objetivo de identificar la fase estacionaria. Se utilizó como patrón de referencia la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19118.

La cinética de crecimiento se realizó en las instalaciones del laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica. Se utilizó la metodología descrita por Román M. y col., 2004.

- Se inoculó la cepa en 20 ml de caldo BHI adicionado de 0.5% de glucosa (preinóculo)
- Seguidamente se incubó a 37°C con agitación de 130rpm durante toda la noche.
- Posteriormente se adicionaron los 20 ml de cultivo crecido en 200 mL del mismo caldo para iniciar la curva de crecimiento.
- Se tomaron muestras del inóculo y se procedió a medir la absorbancia cada 2 horas a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro, utilizando caldo BHI estéril con glucosa al 0.5% como blanco.
- Se midió la absorbancia por un total de 12 horas, tiempo en el que el cultivo alcanzó la fase estacionaria. (Anexo N°5).

#### **2.3.5 Determinación de la sensibilidad a agentes germicidas por el método Kirby Bauer Modificado**

Se determinó la CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de cada agente germicida a diferentes concentraciones (tabla N°9). Se utilizó la metodología descrita por Buzzini P. y col., 2003.

- Se sembró el microorganismo de prueba en tubos conteniendo medio inclinado de agar CASO +0.6% extracto de levadura y se incubó a 37 °C por 24 horas.

- Se tomó con asa bacteriológica estéril de 2 a 3 colonias (de los tubos de siembra en medio inclinada de agar CASO) y se pasó a otro tubo de ensayo conteniendo 10 ml de BHI, se incubó a 37°C por 12 horas (para que la bacteria alcance la fase estacionaria).
- Se comparó la turbidez desarrollada con el tubo patrón de McFarland al 0.5 equivalente a 10<sup>8</sup> UFC/ml.
- Seguidamente se introdujo un hisopo estéril en el caldo y se rotó en las paredes del tubo para eliminar el exceso del inóculo.
- Se inoculó el microorganismo de prueba en toda la superficie del agar Mueller Hinton, se dejaron secar de tres a cinco minutos.
- Se hicieron los pozos sobre la superficie del agar con ayuda de un sacabocado estéril de 6mm de diámetro
- Seguidamente se vertió 25 µL de las soluciones de prueba y la solución patrón de forma alterna por duplicado.
- Se dejó reposar por 30 minutos.
- Finalmente se incubó a 37°C durante 24 horas.
- Se midieron los halos de inhibición con un calibrador Vernier, reportando cada diámetro medido en milímetros. (Anexo N° 6)

**Tabla N° 9: Concentraciones a prueba de los germicidas.**

Germicidas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Hipoclorito de sodio % (v/v)	0.5	1	2	3	4									
Ácido acético % (v/v)	1	2	4	5	10	15	20	25	26	27	28	29		
Ácido cítrico % (p/v)	0.5	1	2	5	10	15	20	25	26	27	28	29	30	31
Formaldehido % (v/v)	0.5	1	2	3	4	6	8							

Fuente: Elaboración propia

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se consideró la menor concentración del agente germicida, cuyo halo de inhibición promedio producido, fue mayor al diámetro del halo de inhibición de la solución de yodo 2% utilizado como patrón de referencia (Perez E. y col., 2012).

### 2.3.6 Preparación de los agentes germicidas a diferentes concentraciones

Para realizar el ensayo *invitro* de la eficacia de los agentes germicidas a base de hipoclorito de sodio, ácido acético, ácido cítrico y formaldehido se prepararon las concentraciones aplicando la siguiente fórmula:

$$C_1V_1=C_2V_2$$

C<sub>1</sub>= Concentración inicial

V<sub>1</sub>= Volumen inicial

C<sub>2</sub>= Concentración final

V<sub>2</sub>= Volumen final

**Tabla N° 10: Preparación de los agentes germicidas**

Agente germicida	Concentración inicial (%)	Concentraciones a prueba (%)
Hipoclorito de sodio	4	0.5, 1, 2, 3, y 4
Ácido acético	50	1, 2, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 26, 27, 28 y 29
Ácido cítrico	100	0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 26, 27, 28, 29, 30 y 31
Formaldehido	37	0.5, 1, 2, 3, 4, 6 y 8

Fuente: Elaboración propia

### 2.3.7 Determinación de la sensibilidad a antibióticos por el método M.I.C.E

Para la determinación de la CMI y de sensibilidad de las cepas de *L. monocytogenes* frente a los antibióticos (tabla N° 11) se hizo uso del método M.I.C.E (Oxoid, 2010) de acuerdo a las indicaciones de su ficha técnica.

- Antes de usar las tiras M.I.C.E se dejaron a temperatura ambiente para prevenir la formación de condensación.
- Se preparó el inóculo adecuado y se comparó la turbidez con el patrón de McFarland 0.5.

- Se introdujo hisopo estéril en la suspensión y se eliminó el exceso de humedad presionándola contra el borde del tubo.
- Se sembró el microorganismo en estudio en placas con agar Mueller Hinton+ 5% de sangre, en tres direcciones diferentes no dejando vacíos.
- Se dejó secar completamente la superficie del agar antes de aplicar las tiras M.I.C.E.
- Se extrajeron las tiras del M.I.C.E del sobre sujetándolo por la parte superior donde se encuentra el logotipo y la abreviatura del antibiótico.
- Se colocaron las tiras M.I.C.E en la superficie del agar ya inoculado con el microorganismo de estudio. Con la ayuda de pinzas estériles se aseguraron las tiras. Cuidando de no mover la posición de las tiras.
- Se incubaron las placas en posición invertida a 37°C/ 24 horas.
- La lectura e interpretación de las pruebas se realizó de acuerdo a los parámetros otorgados por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) del 2012 código M100-S22. (Anexo N° 10).

Para el análisis, no se tuvieron en cuenta los antibióticos de tipo cefalosporinas de tercera generación, puesto que *L. monocytogenes* tiene resistencia natural hacia estos antibióticos (Ruiz Z. y col., 2008).

**Tabla N° 11: Tipo y rango de la gradiente de concentración de los antibióticos a prueba.**

Tiras M.I.C.Evaluators	Rango µg/ mL)
Ampicilina	0.015 – 256
Gentamicina	0.015 – 256
Penicilina	0.015 – 256
Eritromicina	0.015 – 256
Vancomicina	0.015 – 256

Fuente: Oxoid, 2010

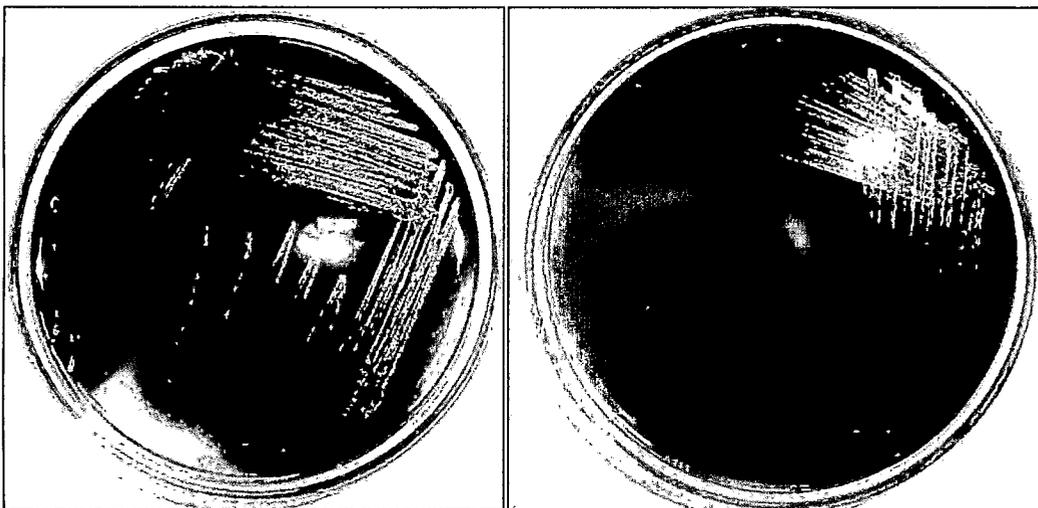
## CAPITULO III

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Aislamiento de *Listeria spp.* a partir de muestras de hortalizas

De acuerdo a la metodología descrita, a partir de las 100 muestras de hortalizas provenientes de 5 mercados de la ciudad del Cusco, se obtuvieron 25% (25/100) cultivos de *Listeria spp.* (tabla N°12) utilizando medios de cultivo agar Palcam y Oxford base. Estos cultivos fueron identificados por presentar colonias pequeñas con una depresión central, redondas de color gris azulado y rodeadas de un halo negro en el caso del agar Oxford base, y colonias pequeñas, redondas de color verde grisáceo rodeadas de un halo marrón – negro en caso del agar Palcam como se observa en la Figura N° 8.

**Figura N° 8: Desarrollo de cultivos de *Listeria spp.* en agares selectivos**



Colonias típicas de *Listeria spp.* en Agar Oxford base (izquierda), agar Palcam (derecha)

La presencia de *Listeria spp.* representa un riesgo para la salud de los consumidores, debido a que estuvo presente en muestras de espinaca, lechuga, tomate, zanahoria y rabanito. Además la alta demanda de éstas hortalizas, ya sea por razones económicas, por su rápida cocción o su valor nutritivo hacen que estos productos formen parte de la dieta diaria de la población cusqueña.

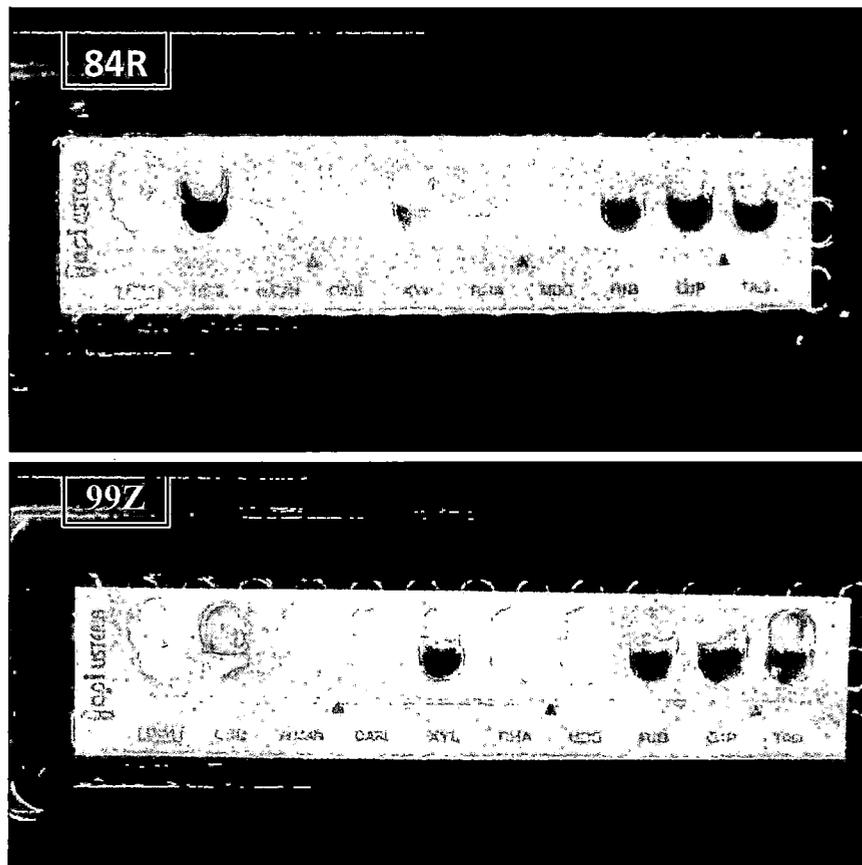
### 3.2 Identificación de *Listeria monocytogenes*

De los 25 cultivos de *Listeria spp*, 7 fueron presuntivos para *Listeria monocytogenes*, mediante el perfil bioquímico de identificación convencional. Estas cepas presuntivas fueron identificadas por ser bacilos Gram positivos pequeños, urea negativa, catalasa positiva, TSI (A/A), indol negativo, movilidad a 25°C con un aspecto de sombrilla y prueba de CAMP positiva con la formación de hemólisis en forma de punta de flechã. Como control en las pruebas se usó la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19118 (Anexo N° 3).

La identificación mediante el Sistema Miniaturizado API Listeria se llevó a cabo con los 7 cultivos presuntivos para *Listeria monocytogenes*.

En las siguientes tablas, se muestran los perfiles de fermentación simplificados, obtenidos con el Sistema Miniaturizado API Listeria.

Figura N° 9. Perfil bioquímico de API Listeria



Finalmente se obtuvieron 2 cepas de *Listeria monocytogenes* : 84R y 99Z provenientes de rabanito y zanahoria respectivamente, con las cuales se evaluó la sensibilidad a agentes germicidas y antibióticos.

A continuación se muestra la presencia de *L. monocytogenes* en los hortalizas así como también en los mercados evaluados.

**Tabla N° 12. Distribución de *L. monocytogenes***

Mercados	Hortalizas	Muestras analizadas	<i>Listeria spp.</i>	Presuntivas para <i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
San Pedro	Espinaca	4	1	0	0
	Lechuga	4	2	0	0
	Rabanito	4	0	0	0
	Tomate	4	1	0	0
	Zanahoria	4	0	0	0
Rosaspata	Espinaca	4	0	0	0
	Lechuga	4	1	0	0
	Rabanito	4	1	0	0
	Tomate	4	0	0	0
	Zanahoria	4	0	0	0
Wanchaq	Espinaca	4	1	0	0
	Lechuga	4	0	0	0
	Rabanito	4	1	0	0
	Tomate	4	1	1	0
	Zanahoria	4	1	0	0
Ttío	Espinaca	4	1	0	0
	Lechuga	4	1	0	0
	Rabanito	4	1	0	0
	Tomate	4	0	0	0
	Zanahoria	4	3	1	0
Vinocanchón	Espinaca	4	1	1	0
	Lechuga	4	0	0	0
	Rabanito	4	2	2	1
	Tomate	4	1	1	0
	Zanahoria	4	1	1	1
<b>Total</b>		<b>100</b>	<b>25</b>	<b>7</b>	<b>2</b>

Elaborada en base al Anexo N°3.

**Tabla N° 13. Presencia de *L. monocytogenes* en hortalizas**

Hortalizas	Casos Positivos		N° de hortalizas analizadas
	N°	%	
Tomate	0	0,00	20
Zanahoria	1	5,00	20
Espinaca	0	0,00	20
Lechuga	0	0,00	20
Rabanito	1	5,00	20
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>2,00</b>	<b>100</b>

Fuente: Elaboración propia.

**Tabla N° 14. Presencia de *L. monocytogenes* en mercados del Cusco**

Mercados	Casos Positivos		N° de hortalizas analizadas
	N°	%	
San Pedro	0	0,00	20
Rosaspata	0	0,00	20
Wanchaq	0	0,00	20
Ttio	0	0,00	20
Vinocanchon	2	10,00	20
<b>TOTAL</b>	<b>2</b>	<b>2,00</b>	<b>100</b>

Fuente: Elaboración propia.

De la evaluación realizada a 100 muestras de hortalizas (tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito) que se expenden en los mercados San Pedro, Rosaspata, Wanchaq, Ttio y Vinocanchon, se aisló *L. monocytogenes* en un 2% (2/100), provenientes del mercado de Vinocanchón. Esto refleja las bajas condiciones higiénicas sanitarias que presenta éste mercado de abasto en la Ciudad del Cusco.

La presencia de *L. monocytogenes* en un 2% representa un riesgo muy grave para la salud de la población, debido a que es la única especie patógena del genero *Listeria* que causa listeriosis humana. Debido al carácter ubicuo de *L. monocytogenes*, la contaminación de las muestras de hortalizas, específicamente de las raíces (zanahoria y rabanito) pudo haberse dado por el

regadío con agua contaminada con heces humanas y animales, uso inadecuado de estiércol como fertilizante, contacto con el suelo, por contaminación cruzada con otros alimentos contaminados, omisión o desconocimiento de las condiciones sanitarias básicas de manipulación por parte de los expendedores, así como la deficiente calidad sanitaria del agua para lavar las verduras luego de la cosecha, que en casos extremos sería la misma utilizada en el riego.

De Curtis M. y col., (2002) en una evaluación realizada a muestras de vegetales mínimamente procesados, encontraron que las zanahorias proveniente de los servicios de comida de la ciudad de Caracas- Venezuela presentaron *L. monocytogenes* en un 9%, lo cual se asemeja ligeramente al presente estudio, donde se aisló *L. monocytogenes* en un 5% en zanahoria.

No se ha encontrado reportes de estudios específicos que indiquen la presencia de *L. monocytogenes* en rabanito, ya sea en ensaladas o en forma individual; sin embargo, al ser también una hortaliza de la cual se consume la parte de la raíz, el riesgo de contaminación por patógenos como *L. monocytogenes* es latente, lo cual se confirma con los estudios de la presente investigación, donde estuvo presente en rabanito en un 5%.

Los resultados de la presente investigación se asemejan a los encontrados por Centurión P. y col., (2004) en un estudio realizado con 100 muestras, 50 muestras de pollo y 50 muestras de verduras frescas (lechuga, col, apio, espárrago y espinaca), obtenidas en diversos mercados y centros de abasto de Lima Metropolitana, Perú, aislaron *L. monocytogenes* de una muestra de pollo (2%) y de una muestra de verduras (2%).

Otros investigadores reportan resultados con mayores aislamientos. Así por ejemplo, Pérez E. y col., (2012) encontraron que *L. monocytogenes* estuvo presente en un 71% en muestras de espinaca que se expenden en los mercados de la ciudad de Trujillo, Perú. En el presente estudio no se llegó a aislar *L. monocytogenes* en muestras de espinaca.

Sin embargo, otros estudios discrepan más significativamente, como los de Martino T. y col., (2008), quienes en una investigación realizada en hortalizas

frescas (cebollino, col, zanahoria, lechuga y frijolitos chinos), en el Instituto de Nutrición e Higiene de los alimentos de la Habana, Cuba, no lograron aislar *L. monocytogenes*, esto posiblemente a que en éste país las condiciones higiénicas sanitarias involucradas desde la producción hasta el consumo final de las hortalizas se realizan de una manera adecuada, previniendo de ésta manera, no solo la listeriosis, sino también las demás ETAs.

Con la presente investigación se demuestra también el incumplimiento con la Resolución Ministerial N° 591- 2008 MINSA, el cual indica la ausencia de *Listeria monocytogenes* en 25 gr de éste tipo de hortalizas. Ello refleja las bajas condiciones higiénicas sanitarias que presenta el mercado Vinocanchón en la Ciudad del Cusco.

Además se debe precisar que aunque el estudio solo abarcó 5 mercados principales de la ciudad del Cusco, los resultados dan una idea del nivel higiénico de las hortalizas que se expenden en estos mercados y sugieren la posibilidad de que se repitan en otros centros de abastos de hortalizas. El manejo sanitario de estos vegetales mejorará conforme se adquiera conciencia del origen de la contaminación, no solo por *L. monocytogenes* sino también por otros microorganismos responsables de ETAs, y se determinen medidas de prevención y control para reducir éste riesgo.

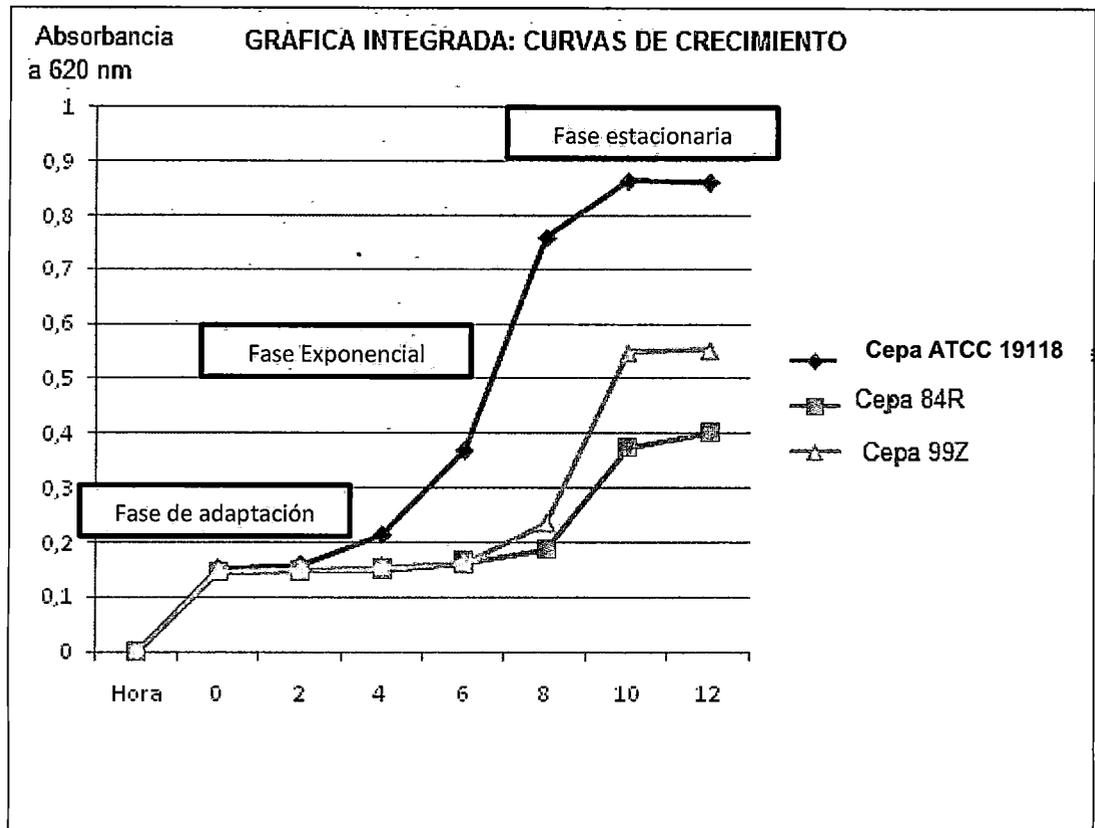
### **3.3 Cinética de Crecimiento**

Mediante la realización de la cinética de crecimiento de las 2 cepas aisladas de *Listeria monocytogenes* (84R y 99Z) junto con la cepa ATCC 19118, se logró identificar la fase estacionaria. Se evidenció que todas alcanzaron la fase estacionaria en 12 horas (Figura N°10), lo cual coincide con estudios realizados por Aldana L. y col., (2000), Robinson T. y col., (2001), Rojas R. (2007) y Guiza P. y col., (2007), quienes también encontraron que *L. monocytogenes* entra en fase estacionaria a partir de la hora 12.

Es éste estudio se pretendió conseguir la fase estacionaria ya que se ha reportado que es el momento en el cual los microorganismos adquieren mayor resistencia; además en ésta fase se han encontrado ciclos de división

reductiva, incremento en la estabilidad del ARN y en la resistencia a condiciones de estrés en bacterias patógenas (Guiza P. y col., 2007).

**Figura N°10. Cinética de crecimiento de las cepas de *L. monocytogenes***



Fuente: Elaboración propia

Las células en fase exponencial son generalmente más frágiles y susceptibles a la injuria que en la fase estacionaria (Robinson T. y col., 2001).

*L. monocytogenes* en fase estacionaria aumenta la expresión del gen *prfA*, el cual proporciona un mecanismo por el que las células pueden responder a condiciones adversas de crecimiento como falta de nutrientes, condiciones ambientales adversas. En fase estacionaria los cultivos de *Listeria* son naturalmente resistentes y son capaces de proteger las células frente a condiciones de estrés (Arráiz N. y col., 2002).

De acuerdo a la gráfica de cinética de crecimiento, las cepas de *L. monocytogenes* pasan por la fase de adaptación, fase exponencial y fase estacionaria. En la fase estacionaria no se incrementa el número de bacterias

(ni la masa u otro parámetro de cultivo), las células desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y durante ella se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia en el curso de las infecciones o intoxicaciones producidas por *L. monocytogenes*. Fue en ésta fase de resistencia que se evaluó la acción de los agentes germicidas frente a las cepas patógenas de *L. monocytogenes*.

### 3.4 Determinación de la sensibilidad de *Listeria monocytogenes* frente a agentes germicidas

**Tabla N°15. Diámetro de halos de inhibición (mm) de cepas de *L. monocytogenes* sometidas a hipoclorito de sodio.**

Concentración del germicida	Halos de inhibición (mm)			
	ATCC 19118	Cepa 84R	Cepa 99Z	Diámetro promedio
Hipoclorito de sodio % (v/v)				
0.5	12.0	10.0	11.5	10.8
1	15.0	13.0	14.0	13.5
2	19.0	17.5	19.5	18.5
3	24.0	24.5	24.0	24.3
4	29.0	26.5	27.5	27.0
Sol. Patrón Yodo 2%	31.8	30.5	31.2	30.9

Fuente: Elaboración propia

La tabla N° 15 muestra los diámetros de las 3 cepas de *L. monocytogenes* al enfrentarlas con el hipoclorito de sodio a cinco concentraciones, el efecto inhibitorio mostrado en las 3 cepas presentaron una desviación típica muy alta con respecto a las medias de los halos de inhibición. Para la cepa 84R  $s=7,13$ ; para la cepa 99Z  $s=6,68$  y para la cepa ATCC  $s=6,83$  (Anexo N°7). Hay demasiada variabilidad dentro de cada grupo con respecto a los halos debido a que estadísticamente los valores de  $s$  son muy altos. Esto se debe a que se usó el hipoclorito de sodio a diferentes concentraciones. Además se observa que los halos de inhibición de la cepa 84R y 99Z son similares a los halos de inhibición control con la cepa ATCC.

**Tabla N°16. Diámetro de halos de inhibición (mm) de cepas de *L. monocytogenes* sometidas a Ácido acético.**

Concentración del Germicida	Diámetro del halo de inhibición producido (mm)			
	ATCC 19118	84R	99Z	Diámetro promedio
1	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>
2	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>
4	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>
5	0.0	0.0	0.0	<b>0.0</b>
10	20.0	21.5	23.0	<b>22.3</b>
15	26.0	25.0	25.5	<b>25.3</b>
20	27.0	27.5	28.0	<b>27.8</b>
25	29.0	30.0	30.0	<b>30.0</b>
26	31.0	32.5	31.0	<b>31.8</b>
27	33.0	35.5	35.0	<b>35.3</b>
28	38.0	38.5	35.5	<b>37.0</b>
29	43.0	40.5	41.0	<b>40.8</b>
Sol. Patrón Yodo 2%	30.8	29.4	30.7	<b>30.1</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla N° 16 muestra los diámetros de las 3 cepas de *L. monocytogenes* al enfrentarlas con ácido acético a doce concentraciones, el efecto inhibitorio mostrado en las 3 cepas presentaron una desviación típica muy alta con respecto a las medias de los halos de inhibición. Para la cepa 84R  $s=16,33$ ; para la cepa 99Z  $s=15,09$  y para la cepa ATCC  $s=15,67$  (Anexo N°7). Hay bastante variabilidad dentro de cada grupo con respecto a los halos debido a que estadísticamente los valores de  $s$  son demasiado altos. Todo ello debido a que se usó el ácido acético a diferentes concentraciones. Además se observa que los halos de inhibición de la cepa 84R y 99Z son similares a los halos de inhibición control con la cepa ATCC.

**Tabla N°17. Diámetro de halos de inhibición (mm) de cepas de *L. monocytogenes* sometidas a Ácido Cítrico.**

Concentración del Germicida	Diámetro del halo de inhibición producido (mm)			
	ATCC 19118	84R	99Z	Diámetro Promedio
Ácido Cítrico % (p/v)				
0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
1	0.0	0.0	0.0	0.0
2	0.0	0.0	0.0	0.0
5	10.0	12.5	12.0	12.3
10	16.0	17.0	17.5	17.3
15	20	21.5	21.5	21.5
20	24	26.0	26.5	26.3
25	28.0	28.0	29.5	28.8
26	29.0	28.5	28.0	28.3
27	30.0	29.0	29.5	29.3
28	29.0	28.0	29.0	28.5
29	30.0	28.5	30.0	29.3
30	30.0	29.0	29.0	29.0
31	29.0	29.0	29.0	29.0
Sol. Patrón Yodo 2%	30.0	31.1	30.3	30.7

Fuente: Elaboración propia

La tabla N°17 muestra los diámetros de las 3 cepas de *L. monocytogenes* al enfrentarlas con ácido cítrico a catorce concentraciones, el efecto inhibitorio mostrado en las 3 cepas presentaron una desviación típica elevada con respecto a las medias de los halos de inhibición. Para la cepa 84R  $s=11,72$ ; para la cepa 99Z  $s=12,10$  y para la cepa ATCC  $s=12,21$  (Anexo N°7). Hay mucha variabilidad dentro de cada grupo con respecto a los halos debido a que estadísticamente los valores de  $s$  son altos puesto que se usó el ácido acético a diferentes concentraciones. Además se observa que los halos de inhibición de la cepa 84R y 99Z son similares a los halos de inhibición control con la cepa ATCC.

**Tabla N°18. Diámetro de halos de inhibición (mm) de cepas de *L. monocytogenes* sometidas al formaldehido.**

Concentración del Germicida	Diámetro del halo de inhibición producido (mm)			
	ATCC 19118	84R	99Z	Diámetro Promedio
Formaldehido % (v/v)				
0,5	16.0	15.0	14.0	<b>14.5</b>
1	25.0	26.0	25.0	<b>25.5</b>
2	32.0	32.5	31.5	<b>32.0</b>
3	40.0	39.0	40.5	<b>39.8</b>
4	45.0	45.0	44.5	<b>44.8</b>
6	58.0	57.0	59.0	<b>58.0</b>
8	62.0	60.5	62.5	<b>61.5</b>
Sol. Patrón Yodo 2%	29.4	30.3	30.1	<b>30.2</b>

Fuente: Elaboración propia

La tabla N° 18 muestra los diámetros de las 3 cepas de *L. monocytogenes* al enfrentarlas con el formaldehido a siete concentraciones, el efecto inhibitorio mostrado en las 3 cepas presentaron una desviación típica demasiado elevada con respecto a las medias de los halos de inhibición. Para la cepa 84R  $s=16,36$ ; para la cepa 99Z  $s=17,61$  y para la cepa ATCC  $s=16,82$  (Anexo N°7). Hay demasiada variabilidad dentro de cada grupo con respecto a los halos. El análisis estadístico nos muestra que los valores de  $s$  son muy altos. Esto se debe a que se usó el formaldehido a diferentes concentraciones. Además se observa que los halos de inhibición de la cepa 84R y 99Z son similares a los halos de inhibición control con la cepa ATCC.

**Tabla N°19. ANOVA para el efecto de los agentes germicidas sobre el crecimiento de *L monocytogenes***

Fuentes de variación		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Diámetro del halo 84R	Inter-grupos	2232,275	3	744,092	3,873	,017
	Intra-grupos	6531,574	34	192,105		
	Total	8763,849	37			
Diámetro del halo 99Z	Inter-grupos	2213,624	3	737,875	3,893	,017
	Intra-grupos	6443,953	34	189,528		
	Total	8657,577	37			
Diámetro del halo ATCC 19118	Inter-grupos	2265,423	3	755,141	3,936	,016
	Intra-grupos	6523,080	34	191,855		
	Total	8788,502	37			

De acuerdo a la tabla de ANOVA, realizada en base al anexo N°7, se observa que existen diferencias significativas en el tratamiento al que fueron sometidas las 3 cepas de *L. monocytogenes*. Esta afirmación se deduce por el valor de significancia alcanzada para la cepa 84R, 99Z y ATCC 19118 siendo  $p = 0,017$ ;  $p = 0,017$  y  $p = 0,016$  respectivamente. El análisis estadístico muestra claramente diferencias estadísticamente significativas al rechazar la  $H_0$  y aceptar la  $H_1$ . Por lo que se afirma que el crecimiento de *L. monocytogenes* es inhibida de acuerdo al germicida y concentración empleada.

Concretamente se quiere saber cuál de los cuatro germicidas difiere de manera significativa y por ende es más eficaz. Por ello se aplicó la prueba Post Hoc para la cepa 84R, 99Z y ATCC de *L. monocytogenes*.

**Tabla N°20. Prueba Post Hoc para la determinación de grupos homogéneos**

CEPA 84 R				
	Tipo de soluciones	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Tukey B <sup>a,b</sup>	Hipoclorito de sodio	5	18,300	
	Ácido cítrico	14	19,071	
	Ácido acético	12	20,917	
	Formaldehido	7		39,286
Duncan <sup>a,b</sup>	Hipoclorito	5	18,300	
	Ácido cítrico	14	19,071	
	Ácido acético	12	20,917	
	Formaldehido	7		39,286

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N°20 se observa mediante la prueba de Tuckey B y Duncan que se formaron dos subconjuntos para la cepa 84R de *L. monocytogenes*. El subconjunto 1 integrado por el hipoclorito de sodio, ácido cítrico y ácido acético. En cambio, el subconjunto 2 solo estuvo integrado por el formaldehido, el cual formó halos de 39,286 mm de diámetro. Por consiguiente, formaldehido es el germicida más efectivo para la inhibición de *L. monocytogenes* y es estadísticamente mejor.

En la tabla N° 21 se observa que mediante la prueba de Tuckey B y Duncan se formaron dos subconjuntos con la cepa 99Z de *L. monocytogenes*, similares a la cepa 84R. El subconjunto 1 integrado por el hipoclorito de sodio, ácido cítrico y ácido acético. En cambio, el subconjunto 2 solo estuvo integrado por el formaldehido el cual formó halos de 39,571 mm de diámetro. Por consiguiente, el formaldehido sigue siendo el germicida más efectivo y estadísticamente mejor para la inhibición de *L. monocytogenes*.

**Tabla N°21. Prueba Post Hoc para la determinación de grupos homogéneos**

CEPA 99 Z				
	Tipo de soluciones	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Tukey B <sup>a,b</sup>	Hipoclorito de sodio	5	19,300	
	Ácido acético	12	19,892	
	Ácido cítrico	14	20,107	
	Formaldehido	7		39,571
Duncan <sup>a,b</sup>	Hipoclorito	5	19,300	
	Ácido acético	12	19,892	
	Ácido cítrico	14	20,107	
	Formaldehido	7		39,571

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 22 se observa también que mediante la prueba Post Hoc se formaron dos subconjuntos con la cepa control ATCC 19118 de *L. monocytogenes*, similares a las cepas 84R y 99Z anteriormente descritas. El subconjunto 1 integrado por el hipoclorito de sodio, ácido cítrico y ácido acético. En cambio, el subconjunto 2 solo estuvo integrado por el formaldehido el cual formó halos de 39,714 mm de diámetro. Razón por la cual el formaldehido continua siendo el germicida más efectivo y además estadísticamente mejor para la inhibición del crecimiento de *L. monocytogenes*.

**Tabla N°22. Prueba Post Hoc para la determinación de grupos homogéneos**

CEPA ATCC 19118				
	Tipo de soluciones	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Tukey B <sup>a,b</sup>	Ácido cítrico	14	19,643	
	Hipoclorito	5	19,800	
	Ácido acético	12	19,983	
	Formaldehido	7		39,714
Duncan <sup>a,b</sup>	Ácido cítrico	14	19,643	
	Hipoclorito	5	19,800	
	Ácido acético	12	19,983	
	Formaldehido	7		39,714

Fuente: Elaboración propia

Estos resultados indican que el formaldehido es muy eficaz contra *L. monocytogenes*, aun cuando esta bacteria se encuentra en la fase de mayor resistencia, es decir, la fase estacionaria, donde generó mecanismos de resistencia a los germicidas. Además, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de formaldehido para inhibir a *L. monocytogenes* mediante el método de Kirby Bauer modificado es del 2%.

Best M. y col (1989) evaluaron la eficacia de 14 desinfectantes sobre cepas de *L. monocytogenes* en presencia de materia orgánica, dentro de las cuales se encontraba el formaldehido al 3,7%. Concluyeron que el formaldehido fue efectivo a dicha concentración cuando las cepas patógenas fueron puestas en suspensión con el desinfectante pero no cuando fueron enfrentadas sobre las superficies de los discos de acero.

No se han encontrado más reportes científicos específicos que indiquen el uso del formaldehido como agente germicida frente a *L. monocytogenes* en superficies, confirmando con los resultados de la presente investigación la efectividad de éste germicida. Éste agente germicida se utiliza en solución acuosa, en estas condiciones posee actividad bactericida, fungicida, virucida, tuberculicida y esporicida (Leveau J. y col., 2002). El formaldehído al 2% puede ser utilizado para el control y eliminación de *L. monocytogenes* mediante la

desinfección de superficies y/o equipos, instalaciones de plantas procesadoras de alimentos mas no para hortalizas, debido a que puede representar un riesgo para la salud, ya que según algunos investigadores está considerado como probable carcinogénico (evidencias suficientes en animales, pero limitadas en seres humanos). (GTM., 2014).

El hipoclorito de sodio no mostró una buena efectividad frente al crecimiento de *L. monocytogenes*. Este germicida químico no llegó a superar el halo de la solución patrón de yodo a la concentración más alta 4%, tanto para las cepas aisladas como para la cepa ATCC 19118, demostrando que *L. monocytogenes* no es sensible sino resistente al hipoclorito de sodio. Además estos resultados indican que la cepa ATCC ya presenta resistencia frente al hipoclorito de sodio al igual que las cepas aisladas de hortalizas,

Los resultados del presente estudio concuerdan con los obtenidos por Perez E. y col (2012) donde usaron hipoclorito de sodio al 1 y 2%, mediante el método de Kirby Bauer modificado, para inhibir a *L. monocytogenes*, utilizando como referencia solución patrón de yodo. Estos investigadores demostraron que *L. monocytogenes* es resistente al hipoclorito de sodio (1 y 2%), ya que además sus halos de inhibición fueron inferiores a los producidos por la solución patrón de yodo, poniendo de manifiesto que el aumento de la resistencia de ésta bacteria se debe al uso indiscriminado de éste germicida en hortalizas. En comparación con el presente estudio, la cepa ATCC al igual que las 2 cepas de *L. monocytogenes* indican que esta bacteria patógena ya presenta una resistencia alta frente al hipoclorito de sodio.

Otro investigador reporta resultados con mayor eficacia del hipoclorito de sodio. Rojas R. (2007), obtuvo un porcentaje de inhibición del 100% sobre cepas de *L. monocytogenes* al ser inhibidas mediante la técnica de porcentaje de inhibición con hipoclorito de sodio (500 ppm), con lo cual demuestra su efectividad.

Con respecto a los ácidos orgánicos para la desinfección de hortalizas, el ácido acético no mostro buena efectividad, debido a que la CMI para inhibir a *L. monocytogenes* es de 26% con respecto a la solución patrón de yodo, siendo demasiado alta dicha concentración para ser usado como desinfectante de hortalizas, por consiguiente *L. monocytogenes* no es sensible al ácido acético.

La cepa ATCC al igual que las 2 cepas de *L. monocytogenes* indican que esta bacteria patógena ya presenta una resistencia alta frente al ácido acético. Éste germicida por ser un ácido orgánico requiere de concentraciones altas para que sea efectiva al descontaminar diversos agentes. Éste ácido orgánico ha sido investigado como una agente antimicrobiano (Vermeulen A. y col., 2007). No está considerado como carcinógeno, sin embargo provoca efectos inmediatos en la salud como quemaduras, corrosión e irritaciones en los ojos, mucosas, piel y en el tracto respiratorio (GTM., 2014).

Perez E. y col (2012) evaluaron el ácido acético al 4 y 5% frente a cepas de *L. monocytogenes*, determinando que la CMI para inhibir a dicha bacteria es de 4 y 5%, lo cual no concuerda con los resultados del presente estudio. Esto posiblemente debido a que estos investigadores no tomaron en cuenta la cinética de crecimiento de las cepas de *L. monocytogenes*, es decir, al momento de enfrentar la bacteria frente al desinfectante no consideraron la fase de resistencia como se realizó en el presente trabajo.

Con respecto al ácido cítrico, *L. monocytogenes* no fue sensible frente a éste ácido orgánico debido a que a la concentración más alta (31%) no llegó a superar el halo de inhibición producido por el patrón de yodo. Además se notó claramente que a partir del 25% al 31% de ácido cítrico, el diámetro del halo producido se mantiene casi constante, lo cual indica que a medida que se incrementa la concentración de éste ácido, la bacteria activa aún más sus mecanismos de resistencia.

Akbas M. y col (2007) estudiaron la eficacia del ácido cítrico en la reducción de *L. monocytogenes* en cortes de lechuga fresca. Concluyeron que el ácido cítrico 0.5% es efectivo para reducir la población de *L. monocytogenes* cuando las lechugas son sumergidas en esta solución por un tiempo de 2 minutos, ya que la población inicial fue de  $5.2 \log_{10}$  UFC/gr y se redujo a  $0.9 \log_{10}$  UFC/gr.

### 3.5 Determinación de la sensibilidad de *L. monocytogenes* a antibióticos

Se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana en las cepas 84R, 99Z y control de *L. monocytogenes* por el método M.I.C.E. Los puntos de corte utilizados para la interpretación de los resultados de *L. monocytogenes* fueron tomados del CLSI 2012 M100- S22. (Tabla N°23).

Las cepas analizadas 84R, 99Z y control de *L. monocytogenes* fueron susceptibles en un 100% a Ampicilina, Penicilina, Eritromicina, Gentamicina y Vancomicina. La Ampicilina tuvo la CMI<sub>90</sub> más baja de 0.06 y 0.12 µg/mL, indicando su mayor efectividad frente a *L. monocytogenes*. Los valores de CMI<sub>90</sub> para Penicilina, Eritromicina, Gentamicina y Vancomicina fueron de 1.00 µg/mL, 0.25 µg/mL, 0.50 µg/mL y 4.00 µg/mL respectivamente, siendo también efectivos en casos de listeriosis. Ninguna de las dos cepas y mucho menos la cepa control mostraron resistencia a los cinco antibióticos evaluados. Se demostró también la buena actuación y eficacia de las tiras M.I.C.E al determinar de manera exacta la CMI de cada antibiótico empleado.

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Vega P. y col (2013), donde reportaron una frecuencia del 100% de sensibilidad de cultivos de *L. monocytogenes* sobre Ampicilina, Penicilina, Gentamicina, Vancomicina, y Tetraciclina, con lo cual concluyeron que los aislamientos de *L. monocytogenes* no muestran un aumento de la resistencia a éstos antibióticos.

De igual manera Gamboa M. y col (2012), evaluaron la susceptibilidad antimicrobiana de *L. monocytogenes* y determinaron que el 98,8% fueron sensibles a Penicilina y Ampicilina; 93,4% a Vancomicina y 84,2% Eritromicina. Concluyeron además que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI<sub>90</sub>) fue de 0.5 µg/ml para Penicilina y Ampicilina, 2.0 µg/ml para Vancomicina y 8 µg/ml para Eritromicina, siendo próximos a los resultados obtenidos.

Es así que Niño J. (2012), encontró aislamientos de *L. monocytogenes* resistentes; 75,6% cepas resistentes a Clindamicina; 8,9% a Azitromicina; 8,9% a Eritromicina y 2,3% a Trimetoprim/ Sulfametoxazol. Mostró mediante éste estudio que los aislamientos de *L. monocytogenes* provenientes de muestras de origen de carne porcino fueron sensibles a los antibióticos más comúnmente

utilizados para tratar la listeriosis humana (Ampicilina, Penicilina, Meropenem, Rifampicina, Tetraciclina y Vancomicina). Para el caso de Penicilina y Ampicilina la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI<sub>90</sub>) hallada fue de 0.5 µg/ml, por lo cual recomienda su uso.

Moura F. y col (2010), concluyeron que 68 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de humanos fueron susceptibles en un 100% a Ampicilina, Cefalotina, Eritromicina, Gentamicina, Teicoplanina y Vancomicina. Para el caso de la Ampicilina se obtuvo una CMI<sub>90</sub> de 2.0 µg/ml, indicando que tiene una actividad efectiva contra *L. monocytogenes*.

**Tabla N°23. Perfil de susceptibilidad antimicrobiana de *L. monocytogenes***

Antimicrobiano	Puntos de corte (µg/mL)			Rango CMI	Cepa 84R CMI <sub>90</sub>	Cepa 99Z CMI <sub>90</sub>	Cepa ATCC 19118 CMI <sub>90</sub>	Susceptibilidad antimicrobiana (%)		
	R	I	S					R	I	S
<b>Ampicilina</b>	NA	NA	≤ 2	0.015 - 256	0.12	0.06	0.06	0 (0)	0 (0)	2 (100)
<b>Penicilina</b>	NA	NA	≤ 2	0.015 - 256	1.00	1.00	0.50	0 (0)	0 (0)	2 (100)
*Eritromicina	≥ 8	1-4	≤ 0.5	0.015 - 256	0.25	0.25	0.25	0 (0)	0 (0)	2 (100)
*Gentamicina	≥ 16	8	≤ 4	0.015 - 256	0.25	0.50	0.50	0 (0)	0 (0)	2 (100)
*Vancomicina	≥ 32	8-16	≤ 4	0.015 - 256	4.00	2.00	4.00	0 (0)	0 (0)	2 (100)

Parámetros ya establecidos

Resultados obtenidos

*CMI, Concentración mínima Inhibitoria; R, resistente; I, intermedio; S, sensible.*

*Los antibióticos en negrita son los antimicrobianos de elección eficaz para el tratamiento de la listeriosis humana según CLSI .*

*\*Punto de corte para *Staphylococcus sp.**

*NA, no aplicable (punto de corte aun no establecido por el CLSI)*

Actualmente, no hay un criterio recomendado por el CLSI para la interpretación de la susceptibilidad de la bacteria *L. monocytogenes*, excepto para el punto de corte de Ampicilina y Penicilina, por eso se aplicaron los puntos de corte recomendados para el criterio de interpretación de *Staphylococcus spp.*

Finalmente Balsalobre H. y col (2004) también concuerda con nuestros resultados. Es así que las cepas de *L. monocytogenes* que aislaron de alimentos de origen animal fueron muy sensibles en un 100% a casi todos los antibióticos que usaron, con la única excepción de una cepa resistente a Tetraciclina. Es así que *L. monocytogenes* fue sensible a Amikacina, Acido Nalidíxico, Amoxicilina-clavulánico, Ampicilina, Cefalotina, Ciprofloxacina, Cloranfenicol, Colistina, Eritromicina, Estreptomina, Gentamicina, Kanamicina, Nitrofurantoina, Penicilina, Trimetoprin-Sulfametoxazol y Vancomicina.

Como se ha demostrado con los resultados hallados, el patrón de sensibilidad a los antibióticos de *L. monocytogenes* ha permanecido relativamente estable con el paso de los años, habiéndose establecido que es sensible en un 100% a una amplia gama de antibióticos como Ampicilina, Penicilina, Eritromicina, Gentamicina y Vancomicina, aspecto que se ha evidenciado en el presente trabajo.

## CONCLUSIONES

1. Se aisló *Listeria spp.* en 25% de muestras de espinaca, lechuga, rabanito, tomate y zanahoria provenientes de cinco mercados principales de la ciudad del Cusco.
2. Se identificó *Listeria monocytogenes* en 2% de las muestras de hortalizas mediante el sistema miniaturizado API Listeria.
3. Se identificó que *Listeria monocytogenes* entra en fase estacionaria a partir de las 12 horas.
4. Se determinó que *Listeria monocytogenes* es sensible al formaldehído a la CMI del 2% comparada con la solución patrón de yodo 2% aun cuando ésta bacteria patógena se encuentra en fase estacionaria, pudiendo ser usado para el control y eliminación de *L. monocytogenes* mediante la desinfección de superficies, equipos, instalaciones de plantas procesadoras de alimentos mas no para hortalizas. Fue sensible al ácido acético a la CMI de 26%, sin embargo fue resistente al hipoclorito de sodio 4% y al ácido cítrico 31%.
5. Se determinó que *Listeria monocytogenes* es sensible en 100% frente a Ampicilina, Penicilina, Eritromicina, Gentamicina y Vancomicina. Sin embargo la Ampicilina tuvo la CMI<sub>90</sub> más baja de 0.06 y 0.12 µg/mL. Estos cinco antibióticos resultaron ser efectivos para tratar la listeriosis.

## RECOMENDACION

- ✓ Continuar la investigación con las dos cepas de *L. monocytogenes* ya aisladas frente a otro tipo de agentes germicidas químicos menos tóxicos para el control y erradicación de esta bacteria en superficies, equipos e instalaciones, debido a que el formaldehído es considerado un compuesto peligroso para la salud.
- ✓ Seguir con la investigación de las dos cepas de *L. monocytogenes* ya aisladas frente a otros agentes germicidas como compuestos orgánicos para la eliminación de esta bacteria patógena en hortalizas tomando en cuenta tiempos de contacto.
- ✓ Realizar un estudio de la cadena productiva de las hortalizas para ver el origen de la contaminación por *L. monocytogenes*.
- ✓ Informar y asesorar al sector productor, consumidor y comercializador sobre los diversos factores que afectan a la calidad hortícola a través de campañas educativas y de concientización, utilizando los medios de comunicación más accesibles.

## REVISION BIBLIOGRAFICA

- Abadias, M., Usall, J. Oliveira, M., Alegre, I., Viñas, I.. Efficacy of neutral electrolyzed water (NEW) for reducing microbial contamination on minimally processed vegetables. International Journal of Food Microbiology. 2008. pag 123: 151-158.
- AESAN Agencia española de Seguridad Alimentaria y Nutrición 2011. Estudios de vida útil para *L. monocytogenes* en determinados productos alimenticios. Revista del Comité Científico 2011. pág. 43 – 59
- Aguado G, Faggian F, Jiménez M. Infecciones por Listeria y Erysipelothrix. En: Ausina RV, Moreno GS. eds. Tratado Seimc de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Ed. Madrid: Médica Panamericana. 2006 p. 451 – 456.
- Akbas, M.; H. Ölmes. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. Journal compilation The society for applied Microbiology. Institute of Technology, Gebze, Kocaeli, Turkey. 6 p. 2007.
- Aldana, L., Sarassa, S. 2000. Efecto de desinfectantes y antimicrobianos naturales frente a cepas de *Listeria monocytogenes*. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.
- Allen S, Koneman E. Bacilos grampositivos aerobios facultativos. En: Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas. 6ª ed. España: Médica Panamericana S.A. 2008, p 729 – 736
- Andrews, M. Determination of Minimum Inhibitory Concentration. Journal Antimicrobial Chemotherapy. 2001.
- Aranceta B. y Pérez-Rodrigo C. Frutas, verduras y salud. Editorial Elsevier. Barcelona, España. 2006, Pp.1-11.
- Arevalo J., Arribas J., Hernández M., Lizán M., Herruzo R. Guía de utilización de Antisépticos. Grupo de trabajo sobre desinfectantes y antisépticos. 2010. Fecha de acceso: 20 de Enero del 2015. Disponible en: <http://vet.unicen.edu.ar/html/Departamentos/Samp/Microbiologia/Guia%20para%20la%20utilizacion%20de%20antisepticos%20en%20PDF.pdf>
- Arias, J. Métodos en Microbiología Farmacéutica. 1 a. edición. Centro Editorial Javeriana CEJA. 2006, 165 p.

- Arráiz N, Salazar L, Takiff H. Condiciones ambientales que afectan la expresión del gen suoM: un factor sigma de estrés en *M. smegmatis*. *Kasmera* 2002, pág. 101-111.
- Audier y Martin. Microbiological safety evaluations and recommendations on fresh produce. *International Journal of Food Microbiology*. 1989
- Balsalobre H, Hernández G. Resistencias a antibióticos en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella entérica* aislados de alimentos de origen animal. Centro de Salud Pública de Utiel. Valencia, España. 2004.
- Bermudez-Aguirre D., Barbosa-Cánovas G. Disinfection of selected vegetables under nonthermal treatments: chlorine, acid citric, ultraviolet light and ozone. *Food Control*. 29: 82-90. . 2013
- Betelgeux. Catálogo de desinfección: productos y equipos para la desinfección en industrias alimentarias. 2013. Consultado el 14 Marzo del 2015. Disponible en: <http://www.betelgeux.es>.
- Best M, Kennedy M, Coates F. Efficacy of variety of disinfectants against *Listeria* spp. Laboratory Centre for Disease Control, Health and Welfare Canadá. Ottawa, Ontario, Canadá. 1989.
- Beuchat L . Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. *World Health Organization*. 31 WHO/FSF/FOS/98.2. p.1. 1998. Fecha de acceso: 25 de Julio del 2015. Disponible en: [http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/surface\\_decont/en/](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/surface_decont/en/).
- Bravo MF. Manejo higiénico de los alimentos. Ed. México: Limusa S.A. 2004. 115 p.
- BIOMÉRIEX SA, 2010. API *Listeria*, Sistema de identificación de *Listeria*. Francia. Disponible en: [www.bioMérieux.com](http://www.bioMérieux.com)
- Brock T, Madigan M, Martinko J, Parker J. Conservación de los alimentos y enfermedades microbianas transmitidas por alimentos. En: *Biología de los microorganismos*. 10a Ed: Pearson. 2003. p 942 – 956.
- Brooks, G., Butel, J., Y Morse, S . *Microbiología medica de Jawets, Melnick y Adelberg* (Décimo octava ed.). México. 2005.

- Buzzini P, Pieroni A. Antimicrobial activity of extracts of *Clematis vitalba* towards pathogenic yeast and yeast-like microorganisms. *Fitoterapia* 2003, 74:397-400.
- Carrasco E. Análisis del Riesgo Microbiológico: *Listeria monocytogenes* en ensaladas de IV gama (Tesis Doctoral). Universidad de Córdoba, Córdoba. 2007.
- Cecchini E, Picandet AM, Gonzalez-Ayala SE. Listeriosis. En: Cecchini E, Gonzalez- Ayala SE, editores. *Infectología y enfermedades infecciosas*. 1a ed. Argentina. 2008
- Centurión P. Takajara S. Determinación de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras frescas obtenidos en mercados y centros de abastecimiento de Lima Metropolitana. Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Lima, Perú. 2004.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standars for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty – Fourth Informational Supplement. M100-S22. 2012.
- Cossart P. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect* 2007. Pág: 1143-1146.
- Datta A R. *L.monocytogenes*. En: Miliotis MD., Bier JW. eds. *International Handbook of Foodborne Pathogens*. New York: Marcel Dekker, INC. 2003, p. 105-122
- De Curtis M, Franceschi O, De Castro N. *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición- Universidad Central de Venezuela*. Vol. 52 2002, pág. 282-288.
- Disson O, Lecuit M. 2012. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*. *Virulence*. 2012. Pág. 213-221.
- Edwards D. *Antimicrobiol Drug Action*, MacMillan Pvt. Co., London, 1980. pp 193-216.
- Fajardo Olivares M, Santos Morano A, Zarallo Cortés L. Otitis media supurada por *Listeria grayi*. *Acta Pediatrica Port* 39:12-13. 2008

- FDA-CFSAN. *Listeria monocytogenes*. En: Bacteriological Analytical Manual. Novena edición. Capítulo 10. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twenty-Second Informational Supplement M11-S22. 2012. Volume 32 N° 3. 2002.
- Food and Drug Administration. Bad Bug Book. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook, *Listeria monocytogenes*. 2011.
- Gamboa M, Mejía W, Moreno O, Buitrago M, Pérez P, Ruíz B, Poutou P, Carrascal C, Velazco B, Ocampo G. Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria* species isolated from swine processing facilities in Colombia. Colombia. Journal of Swine Health and Production. 2012.
- García J.E., López R., Prieto J. Antimicrobianos en Medicina. Sociedad Española de Quimioterapia. Prous Science. Barcelona España. 1999; 193-204.
- Garrity G. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The taxonomic Outline of Bacteria and Archaea. Segunda Edición. 2005
- Garza Velasco R, Monzuarzo TS, Hernandez Gomez L. "La Listeriosis humana y el ciclo infeccioso asociado a su agente etiológico". Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM 2012. Consultado el 18 de febrero de 2015. Disponible en <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Listeria.pdf>
- Guía Veta A. Guía para el establecimiento de sistemas de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por Alimentos y la Investigación de brotes de Toxi-Infecciones Alimentarias. 2001. Fecha de acceso: 28 setiembre 2014. Disponible en: <http://epi.minsal.cl/epi/html/software/guias/Veta/E/homepage.htm>.
- Guiza P. Rincon P. Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica, sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*. Pontificia universidad javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de microbiología industrial. Bogotá. 2007.

- Gómez, E. "Listeriosis humana: importancia, grupos de riesgo y portadores". Listeria en alimentos. Ministerio de Sanidad y Consumo. 1993.
- Goodburn C., and Wallace C. The microbiological efficacy of decontamination methodologies for fresh produce: A review. Food Control. 2012, pág. 418-427.
- Graves LM, Helsel LO, Steigerwalt AG, Morey RE, Daneshvar MI, Roof SE, Orsi RH, Fortes ED, Milillo SR, Holf H. *Listeria monocytogenes*: A Causative Agent of Gastroenteritis? European Journal Clinical Microbiology Infection disease. 2010. 224:185-193.
- GTM (GRUPO TRANSMERKIN). Hoja de datos de seguridad del formol. 2014. Fecha de acceso: 10 de Agosto del 2015. Disponible en: <http://www.gtm.net/images/industrial/f/FORMALDEHIDO.pdf>, <http://www.gtm.net/images/industrial/h/HIPOCLORITO%20DE%20SODI O.pdf>, <http://www.gtm.net/images/industrial/a/ACIDO%20GLICOLICO.pdf>
- Harrison J. y col. Prevención de enfermedades transmitidas por ,os alimentos. Consultado el 16 de diciembre de 2014. Disponible en: <http://www.fcs.uga.edu/pubs/pdf/fdns-e-sp-4.pdf>.
- Hernández B, Godoy J. Resistencias a antibióticos en *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* aislados de alimentos de origen animal. Revista salud ambiental 2004; 4: 42-46.
- Hitchins A. Bacteriological Analytical Manual. Detection and enumeration of *L. monocytogenes* in foods. 2008.
- Hung Y., Tilly P., Kim C. Efficacy or Electrolyzed Oxidizing (EO) water and chlorinated water for inactivation of Escherichia coli O157:H7 on strawberries and broccoli. Journal of Food Quality. 2010. 33: 559-577.
- ICMSF (International Commission on Microbiological Specification for Foods). Microorganismos de los alimentos 6. Ecología Microbiana de los productos alimentarios. Editorial Acriba. Zaragoza.2001. 201- 229.
- INCB (Instituto Nacional de Ciencias Biológicas). "Manual de Laboratorio de Microbiología Sanitaria", Departamento de microbiología, 6° Edición. 2002

- Issa Z, Kamitani Y., Miwa N., Muhimbula H., Iwasaki K. Application of slightly acidic eletrolyzed water as a potencial non-thermal food sanitizar for decontamination of fresh ready-to-eat vegetables and sprouts. Food Control. 2011. 22: 601-607
- Jay J. M, Loessner MJ, Golden DA. Listeriosis de origen alimentario. En: Microbiología moderna de los alimentos. 5ª ed. Acribia S.A. España. 2009. p. 586 – 612.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. Microbiología Moderna de los Alimentos. 4ta edición. Zaragoza, España, editorial Acriba. 2002.
- King K. R. The Presence of Bacterial Pathogens in Recirculating Aquaculture system Biofilms and their response to various sanitizer, doctor of philosophy in food science and technology, faculty of the virginia polytechnic institute and state university, blacksburg, Virginia. 2001.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schereckenberger P,Winn W. Diagnóstico Microbiológico. 6ª edición., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. 2008.
- Laboratorio López Valero, S.L. Ficha Técnica de Citrinox (Acido cítrico). 2015. Fecha de acceso: 01 de Mayo del 2015. Disponible en: <http://www.lablopezvalero.com/archivos/files/fichastecnicas/FTCitrinoxrev01.pdf>
- Lang Halter, Neuhaus K, Scherer S. *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. Int J Syst Evol Microbiol 2013, 63:641-647.
- Lamikanra O. Fresh-cut Fruits and Vegetables. Science, Technology and Market. CRC press. United States of America. 2002.
- Leclercq A, Clermont D, Bizet C, Grimont PA, Le Fleche-Mateos A, Roche SM, Buchrieser C, Cadet-Daniel V, Le Lecuit M. Human listeriosis and animal models. Microbes Infect 2007. 9:1216-1225.
- Lenntech. Sodium hypochlorite as a disinfectant. 2013. Consultado 05 de Febrero del 2014. Disponible en: <http://www.lenntech.es/procesos/desinfeccion/quimica/desinfectanteshipoclorito-de-sodio.html>.

- Leveau, J. Y. y Bouix, M. Manual Técnico de Higiene, Limpieza y Desinfección. 1ª. Edición. Mundi Prensa. Madrid – España. 2002. 623 p.
- Llano T. Utilización del Ácido cítrico en limpieza de pintura. Tesis de master. Universidad Politécnica de Valencia Facultad de Bellas Artes. 2007. Departamento Conservación – Restauración de bienes. Disponible en:  
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/13397/Tesis%20de%20M%C3%A1ster.pdf?sequence=1>
- Lorber B. *Listeria monocytogenes*. En: Gerard L. Mandell, John E. Bennet, Dolin R, editores. Mandell, Douglas and Bennet's Principles and practice of Infectious Diseases. 6ª ed. NY: Elsevier, 2005. p. 2478-84.
- Marco N. R. *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos LPC. Resistencia a los antibióticos. Universidad Zaragoza. España. Trabajo fin de Master. 2011.
- Martínez J., Sánchez F. Mecanismo de acción de los antibióticos. Jano 2007. n. ° 1.660. pag: 28-34.
- Martino T. Lemus D. Leyva V. Tejedor R, De los Reyes M. Soto P. Incidencia de *Listeria spp.* en hortalizas frescas. Revista Cubana de Salud Pública. 2008.
- Marzocca M.; Marucci, P.; Sica, M.; Alvarez E. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras de ambientes de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. Revista Argentina de Microbiología 2004. 36: 179-181.
- MERCK. Ficha de datos de seguridad del ácido cítrico. 2006. Fecha de acceso: 10 de Agosto del 2015. Disponible en: [http://www.merck-performance-materials.com/merck-ppf/detailRequest?unit=CHEM&owner=MDA&productNo=130221&language=ES&country=CO&docType=MSD&source=GDS&docId=/mda/chemicals/msds/es-CO/130221\\_SDS\\_CO\\_ES.PDF](http://www.merck-performance-materials.com/merck-ppf/detailRequest?unit=CHEM&owner=MDA&productNo=130221&language=ES&country=CO&docType=MSD&source=GDS&docId=/mda/chemicals/msds/es-CO/130221_SDS_CO_ES.PDF)
- MINISTERIO DE SALUD DEL PERÚ. Información Estadística sobre Listeriosis – años 2001 al 2008. La Libertad. Gerencia Regional de Salud

La Libertad – Oficina de Informática, Telecomunicaciones y Estadística, Trujillo. 2009.

- Ministerio de Salud. Norma Sanitaria que establece los criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Resolución Ministerial N° 591-2008. 2008. Fecha de acceso: 04 de junio de 2015. Disponible en: [http://www.saludarequipa.gob.pe/desa/archivos/Normas Legales/alimentos/RM591MINSANORMA.pdf](http://www.saludarequipa.gob.pe/desa/archivos/Normas_Legales/alimentos/RM591MINSANORMA.pdf)
- Moellering RC. Linezolid: The First Oxazolidinone Antimicrobial. *Ann. Intern. Med.* 2003. 138: 135-142.
- Sjölund M. Development and stability of antibiotic resistance. Uppsala University, Sweden. Doctoral Thesis. 2004.
- Monnier A, Lecuit M, Allerberger F. *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010. 60:2210-2214.
- Mora M., Quinto E. Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Barcelona, España, 2007.
- Moragas M, Martínez-Yelamos S, Murillo O, Fernández-Viladrich P. Brain abscess due to *Listeria monocytogenes* in adults: six cases and review of the literature. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010. 28:87-94.
- Moura F, Victor B, Alves R, Christina V, Ernesto Hofer. Antimicrobial Susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. *Revista de Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 2010.
- Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. *Microbiología Médica.* 5ª edición., Elsevier Science, Barcelona. 2006.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología médica.* 5ª ed. España: Elsevier. 2006. 963 p.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Listeria y Erysipelothrix.* En: eds. *Microbiología clínica.* 6ª ed. Barcelona: Elsevier España SL, 2009; p. 255-60. Ediciones Journal; p. 546-53.

- NCCLS (National Committee for clinical Laboratory Standards). Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por diffusion en agar. 2000.
- Negroni M. Microbiología estomatológica. Fundamentos y guía práctica. Buenos Aires. Médica Panamericana. 2009.
- Niño J. Estudio de resistencia microbiana en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de cortes de carne de origen porcino. Trabajo de grado. Pontificia Universidad Javeriana. El Salvador. 2012.
- Norrung B, Kirk JA, Buncic S.. Main concerns of pathogenic microorganisms in meat. En: Toldra F. ed. Safety of Meat and Processed Meat. Ed. Springer. 2009. p 3-30.
- OMS. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para consumir. Informe técnico. Serie sobre Evaluación de Riesgos Microbiológicos, N° 5. 265 págs. 2004.
- Oxoid. M.I.C.Evaluators. Basingstoke. United Kingdom. 2010. Disponible en: [www.oxoid.com](http://www.oxoid.com)
- Painter J, Slutsker L. Listeriosis in Humans. En: Ryser ET, Marth EH, eds. Listeria, Listeriosis and Food Safety. 3a Ed. Taylor and Francis Group. 2007. p 85-109.
- Pamer E. G. Immune responses to *Listeria monocytogenes*. Nat Rev Immunol 2004. 4:812-823.
- Pangloli P., Hung Y. Reducing microbiological risk on blueberries through innovaties washing technologies. Food Control.2013. 32: 621-625.
- Perez E, Sigaran A. Determinación de la resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de muestras de espinaca *Spinacea oleracea* utilizando germicidas para la desinfección de alimentos. Universidad de el Salvador. Facultad de Química y Farmacia. San Salvador, el Salvador, Centro América. 2012.
- Pérez RC, Mercado RM, Carrascal CA. Incidencia de *Listeria spp.* en carcasas de pollo congelado en un supermercado del nororiente de Bogotá. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas 2008. Pág. 141-146.

- Pérez R. Chávez C. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito, expendidos en mercados de Trujillo, Perú. Revista "Ciencia y Tecnología". Escuela de Postgrado-UNT. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. 2011.
- Poros-gluchowska J, Markiewicz Z. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes*. Act Microbiol Pol. 2003. Pág. 52
- Power EGM. Aldehydes as biocides. ProMedChem, 1995;34:149-201
- Restrepo A, Robledo J, Leiderman E, Restrepo M, Botero D, Bedoya B. Enfermedades infecciosas. 6ª edición., Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín. 2004.
- Remington A. Farmacia, 20ª edición. Tomo II. editorial Medica Panamericana. 2001.
- Remuzgo Martínez. "El cultivo organotípico tridimensional de sistema nervioso central como modelo para el estudio de la respuesta cerebral frente a *Listeria monocytogenes*". Universidad de Cantabria. Facultad de Medicina. Dpto. de Fisiología y Farmacología. Tesis doctoral. 2014.
- Remuzgo Martínez, Ramos Vivas J. *Listeria monocytogenes* and macrophages. Microb Focus 2013. Pág. 4-6.
- Robinson, T., Olosimbo, A., Kaloti, A., Ocio, M., Baranyi, J., Mackey, B. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology 2001.p 163–173.
- Rocourt J, Buchrieser C. The genus *Listeria* and *L. monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy and identification. En: Elliot TR, Elmer HM, eds. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3a Ed. Taylor and Francis Group. 2007. p 1-20.
- Rojas, C. Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *Listeria monocytogenes* aisladas de productos cárnicos crudos de una planta de procesados en Bogotá. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 2007.
- Román, M., Tirado, S. Evaluación de la formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas sp.* En empaques utilizados en la industria de alimentos. Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. 2004.

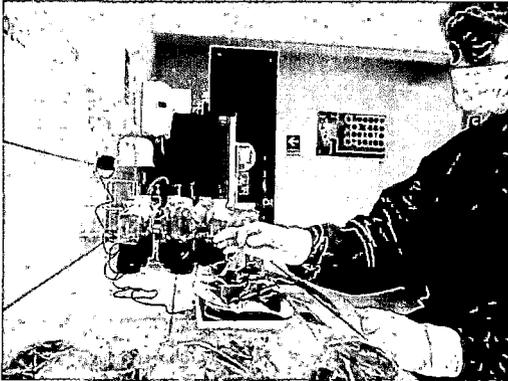
- Ruiz Z, Poutou R, Carrascal A. Resistencia antimicrobiana y a desinfectantes de *Listeria* spp, Nova- Publicación Científica en ciencias Biomédicas. 2008; 6 (10); 101-236.
- Sjölund M. Dissemination of multidrugresistant bacteria into the Arctic. *Emerg Infect Dis* 14(1):70–72. 2008
- Srey S., Kabir I., Ha S. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. 2013. 31: 572-585
- Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* 2007. Pág. 9.
- Thévenot D, Dernburg A, Vernoz C. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork, meat industry and its product. *Journal of Applied Microbiology*, 2006. pag 101
- Todar K. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. 2012. Fecha de acceso: 28 noviembre 2014. Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net>.
- Toledo M, Rina A. "Formulación de un desinfectante a partir del aceite esencial de orégano (*Lippia graveolens*) para la sanitización de superficies, material y equipo de uso hospitalario y de laboratorio". El Salvador, Sección de Investigación Aplicada y Tesis Profesionales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, 2001.
- Torija Isasa. "Factores determinantes de la calidad nutritiva de frutas y hortalizas frescas". En Aspectos relativos a la calidad de frutas y hortalizas frescas. Monografía I. Pag. 12-23. Fundación Sabor y salud. Valencia. 2002.
- Torres K, Sierra S, Poutou R, Carrascal A, Mercado M. Patogénesis de *L. monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Rev. MVZ Córdoba* 2005. 10:1 p 511-543.
- Vázquez JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol.* 2001. *Rev.* 14(3):584-640.
- Vega P, Mercado P. Sensibilidad antibacteriana de cultivos de *Listeria* sp. Aislados de lugares de expendio de pollo y quesos en mercados de

la Ciudad de Trujillo (Perú). Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo, Perú. 2013

- Vermeulen A, Gysemans K, Bernaerts K, Geeraerd A.H, van Impe, J; Debevere J, Devlieg F. Influence of pH, wáter activity and acetic acid concentration on *Listeria monocytogenes* at 7°C. Data collection for the development of a growth/no growth model. J. Food Microbiology. 2007.

# **ANEXOS**

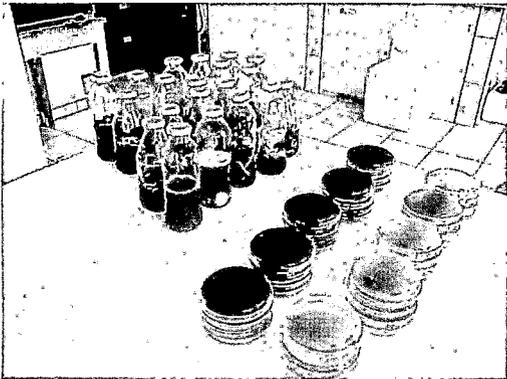
## ANEXO N° 1. AISLAMIENTO DE *Listeria spp.* A PARTIR DE HORTALIZAS



Pre-enriquecimiento de las muestras con caldo de Enriquecimiento selectivo para *Listeria* según Fraser (base).



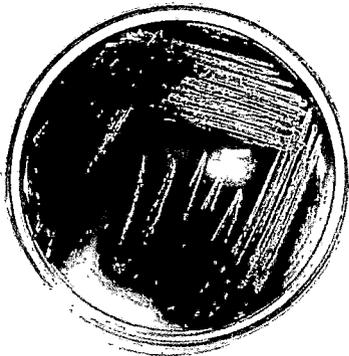
Enriquecimiento con suplemento selectivo para *Listeria* según Fraser.



Frascos conteniendo caldo Fraser, después de las 48 horas de incubación.



Siembra de inóculo a partir de caldo Fraser a placas con agar selectivo para *Listeria*: Agar Palcam y Oxford base.

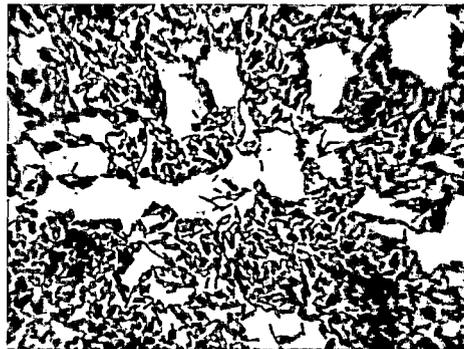


Agar Oxford base, colonias pequeñas, redondas, color gris azulado rodeadas de un halo negro con una depresión central.

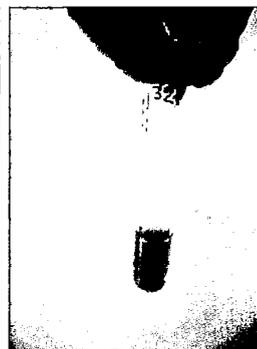
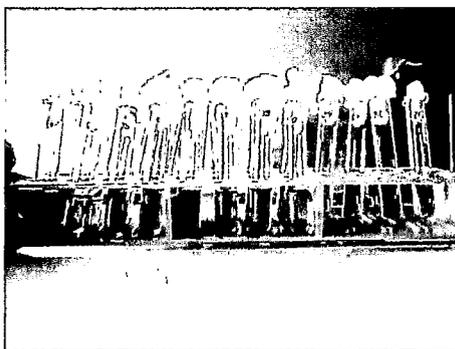


Agar Palcam, colonias pequeñas, redondas de color verde- grisáceo rodeadas de una halo marrón- negro.

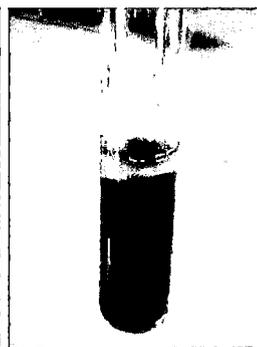
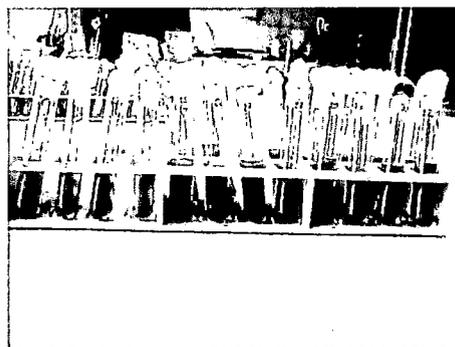
**ANEXO N° 2. IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes* MEDIANTE  
PERFIL BIOQUÍMICO CONVENCIONAL**



Coloración Gram: Bacilos cortos Gram Positivos. Observación microscópica (100 X)



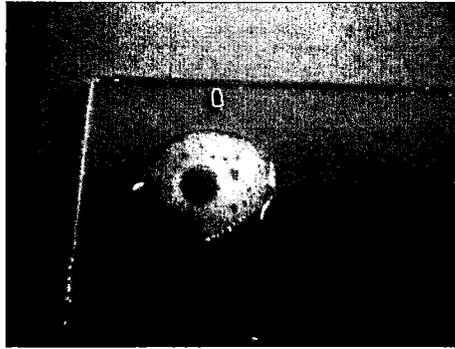
Urea negativa, *Listeria* no metabolizó la urea, porque no sintetiza la enzima ureasa.



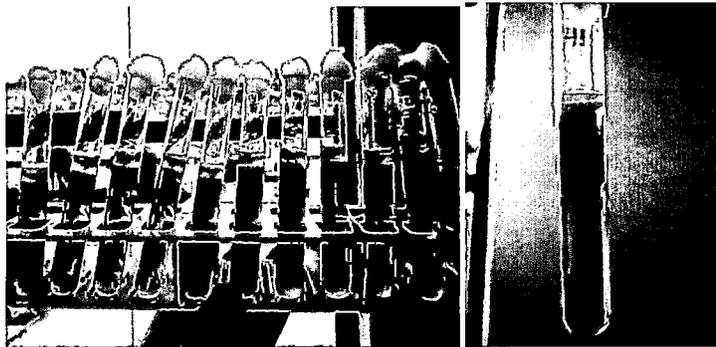
Indol Negativo, formación de un anillo de coloración amarillo.



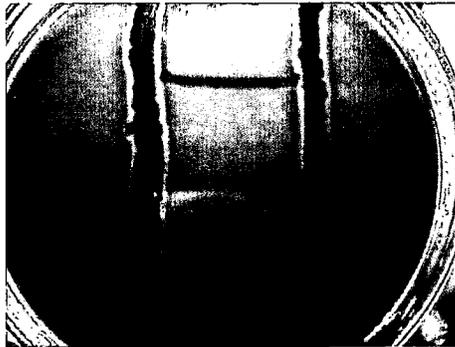
TSI A/A, *Listeria* metaboliza 2 ó más azúcares.



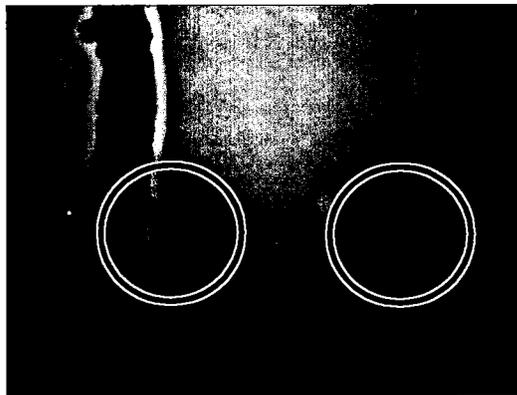
Catalasa positiva, *Listeria* produce burbujas ya que posee la enzima catalasa para degradar el peróxido de hidrogeno.



Mobilidad a 25°C en forma de "sombra" por la presencia de flagelos.



Prueba de CAMP positiva, se observa el área de hemolisis en forma de "punta de flecha".



**ANEXO N° 3. RESULTADOS DEL PERFIL BIOQUIMICO DE IDENTIFICACION CONVENCIONAL PARA *Listeria spp.***

Mercado	Nro cepa	Crecimiento Agar Oxford	Crecimiento Agar Palcam	TSI	Indol	Urea	Catalasa	Prueba de CAMP	Movilidad a 25°C	Coloración Gram
	<b>ATCC 19118</b>	+	+	A/A	-	-	+	+	+	<b>BGP</b>
<b>S A N P E D R O</b>	01E	+	+	A/A	-	-	+	+	+	CGP
	02E	+	-							
	03E	+	-							
	04E	+	-							
	05L	+	-							
	06L	+	+	A/A	-	-	+	+	+	CGP, BGP
	07L	+	-							
	08L	+	+	A/A	-	-	+	+	+	BGP
	09R	+	-							
	10R	+	-							
	11R	+	-							
	12R	+	-							
	13T	+	-							
	14T	+	-							
	15T	+	+	A/A	-	+	+	+	+	CGP
	16T	+	-							
	17Z	+	-							
	18Z	+	-							
19Z	+	-								
20Z	+	-								

Mercado	Nro cepa	Crecimiento Agar Oxford	Crecimiento Agar Palcam	TSI	Indol	Urea	Catalasa	Prueba de CAMP	Movilidad a 25°C	Coloración Gram
<b>R O S A S P A T A</b>	21R	+								
	22R	+	+	A/A	-	-	+	+	+	CGP, BGP
	23R	+	-							
	24R	+	-							
	25Z	+	-							
	26Z	+	-							
	27Z	+	-							
	28Z	+	-							
	29L	+	+	K/A	+	-	+	+	+	CGP
	30L	+	-							
	31L	+	-							
	32L	+	-							
	33T	+	-							
	34T	+	-							
	35T	+	-							
	36T	+	-							
	37E	+	-							
	38E	+	-							
	39E	+	-							
	40E	+	-							

Mercado	Nro cepa	Crecimiento Agar Oxford	Crecimiento Agar Palcam	TSI	Indol	Urea	Catalasa	Prueba de CAMP	Movilidad a 25°C	Coloración Gram
<b>W A N C H A Q</b>	41Z	+	+	A/A	-	-	+	-	-	CGP
	42Z	+	-							
	43Z	+	-							
	44Z	+	-							
	45T	+	-							
	46T	+	-							
	47T	+	-							
	48T	+	+	A/A	-	-	+	+	+	BGP
	49R	+	+	A/A	-	-	+	-	-	CGP
	50R	+	-							
	51R	+	-							
	52R	+	-							
	53L	+	-							
	54L	+	-							
	55L	+	-							
	56L	+	-							
	57E	+	-							
	58E	+	-							
	59E	+	-							
	60E	+	+	A/A	-	-	+	-	-	CGP

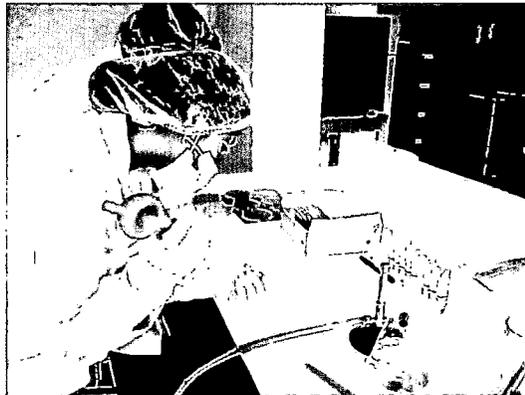


Mercado	Nro cepa	Crecimiento Agar Oxford	Crecimiento Agar Palcam	TSI	Indol	Urea	Catalasa	Prueba de CAMP	Movilidad a 25°C	Coloración Gram
<b>V I N O C A N C H O N</b>	81R	+	-							
	82R	+	+	A/A	-	-	+	+	+	BGP
	83R	-	-							
	84R	+	+	A/A	-	-	+	+	+	BGP
	85L	+	-							
	86L	+	-							
	87L	+	-							
	88L	+	-							
	89E	+	+	A/A	+	-	+	+	+	BGP
	90E	+	-							
	91E	+	+	A/A	-	-	+	+	+	BGP
	92E	+	-							
	93T	+	+	A/A	-	-	+	+	+	BGP
	94T	-	-							
	95T	+	+	A/A	-	-	+	-	-	BGP
	96T	+	-							
	97Z	+	-							
	98Z	+	+	A/A	+	-	+	+	+	CGP
	99Z	+	+	A/A	-	-	+	+	+	BGP
	100Z	+	+	K/A	-	+	-	-	-	CGP

E= Espinaca, L= Lechuga, R= Rabanito, T= tomate, Z= Zanahoria, C (Cocos), B (Bacilos), CB (Cocobacilos), GP (Gram Positivo), GN (Gram Negativo)

A partir de 100 muestras de hortalizas, se obtuvieron 25 cultivos de *Listeria spp.*  de donde se identificó 7 cultivos presuntivos como *Listeria monocytogenes*  mediante el perfil de identificación bioquímico convencional. Se utilizó como cepa patrón para las pruebas de identificación, *Listeria monocytogenes* ATCC 19118.

**ANEXO N° 4. IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes* MEDIANTE API  
LISTERIA (BIOMÉRIEUX, FRANCIA)**



Se reunió fondo y tapa de una cámara de incubación y se repartió aproximadamente 3 mL de agua destilada en los alvéolos del fondo para crear una atmósfera húmeda.



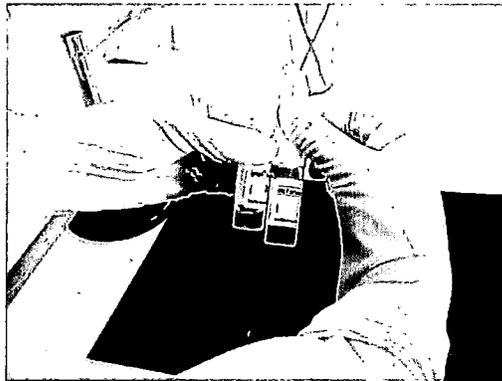
Se colocaron las galerías en la cámara de incubación.



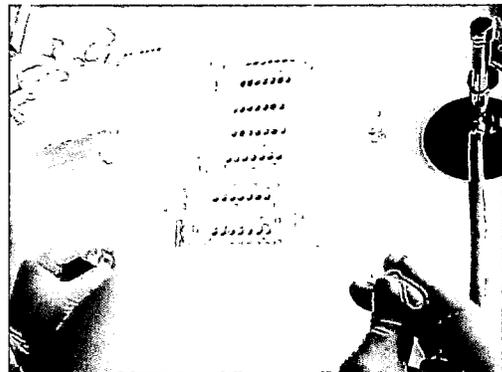
Se cogieron colonias bien aisladas. Se usaron cultivos jóvenes (18-24 horas).



Se realizó una suspensión de turbidez igual a 1 McFarland.



Esa suspensión se comparó con un patrón de la escala McFarland, y fue utilizada de inmediato.



Se repartió la suspensión bacteriana precedente, llenando cuidadosamente cada cúpula.



Antes de la incubación



Se cerró la cámara de inmediato y se incubó a 36°C / 24 horas.

**ANEXO N°5. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS DE  
*Listeria monocytogenes***



La cinética de crecimiento se realizó en las instalaciones del laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica.

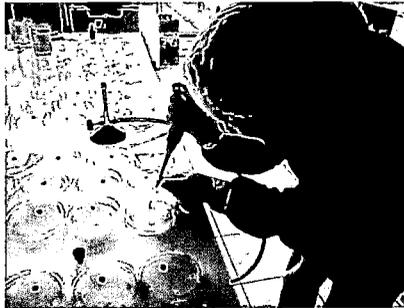
## ANEXO N°6. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A AGENTES GERMICIDAS POR EL MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO



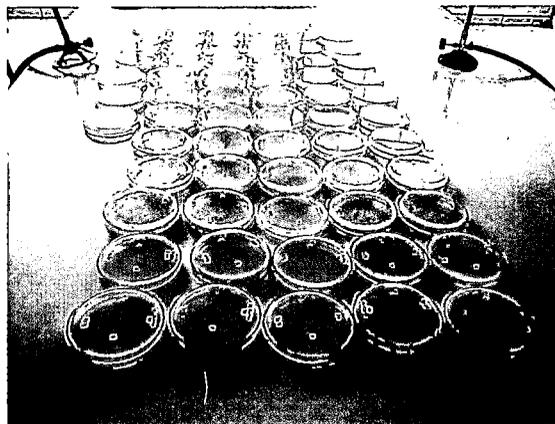
Se inocularon las dos cepas sobre la superficie del agar Muller Hinton.



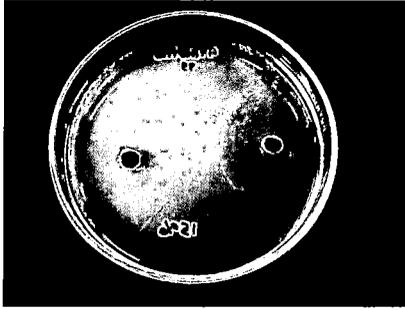
Se realizaron pozos de 6mm de diámetro y seguidamente se vertió 25 ul de la solución patrón de yodo



Se vertieron también los agentes germicidas: hipoclorito de sodio, ácido acético, ácido cítrico y formaldehído.



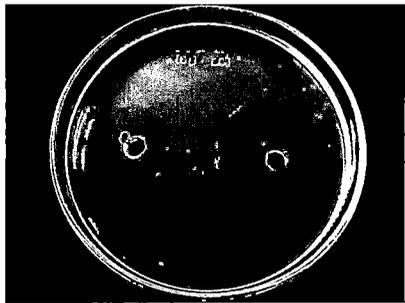
Después de la incubación se midieron los halos de inhibición con un Vernier.



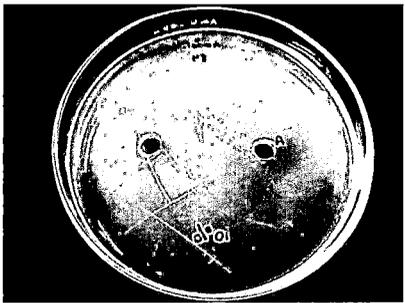
Halo de inhibición  
producida por el Ácido  
acético



Halo de inhibición  
producida por el  
Formaldehído



Halo de inhibición  
producida por el  
Hipoclorito de Sodio



Halo de inhibición  
producida por el Ácido  
citríco

## ANEXO N°7. Tratamiento Estadístico- ANOVA

### Estadísticos descriptivos

Descriptivos									
		N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
						Límite inferior	Límite superior		
<b>Diámetro del halo (84R)</b>	Hipoclorito	5	18,300	7,1292	3,1883	9,448	27,152	10,0	26,5
	Ácido acético	12	20,917	16,3274	4,7133	10,543	31,291	,0	40,5
	Ácido cítrico	14	19,071	11,7242	3,1334	12,302	25,841	,0	29,0
	Formaldehido	7	39,286	16,3754	6,1893	24,141	54,430	15,0	60,5
	Total	38	23,276	15,3903	2,4966	18,218	28,335	,0	60,5
<b>Diámetro del halo (99Z)</b>	Hipoclorito	5	19,300	6,6765	2,9858	11,010	27,590	11,5	27,5
	Ácido acético	12	19,892	15,0872	4,3553	10,306	29,478	,0	35,5
	Ácido cítrico	14	20,107	12,0961	3,2328	13,123	27,091	,0	30,0
	Formaldehido	7	39,571	17,6055	6,6542	23,289	55,854	14,0	62,5
	Total	38	23,518	15,2967	2,4814	18,491	28,546	,0	62,5
<b>Control (ATCC 19118)</b>	Hipoclorito	5	19,800	6,8337	3,0561	11,315	28,285	12,0	29,0
	Ácido acético	12	19,983	15,6717	4,5240	10,026	29,941	,0	43,0
	Ácido cítrico	14	19,643	12,2072	3,2625	12,595	26,691	,0	30,0
	Formaldehido	7	39,714	16,8198	6,3573	24,159	55,270	16,0	62,0
	Total	38	23,468	15,4119	2,5001	18,403	28,534	,0	62,0

Fuente: Elaboración propia.

### Prueba de Kolmogorov- Smirnov

		Diámetro del halo (84R)	Diámetro del halo (99Z)	Diámetro del halo Control (ATCC 19118)
N		38	38	38
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	23,276	23,518	23,468
	Desviación típica	15,3903	15,2967	15,4119
Diferencias más extremas	Absoluta	,119	,143	,137
	Positiva	,119	,143	,137
	Negativa	-,111	-,118	-,119
Z de Kolmogorov-Smirnov		,734	,882	,842
Sig. asintót. (bilateral)		,655	,419	,478

a. La distribución de contraste es la Normal.

b. Se han calculado a partir de los datos.

Si sig > a 0,05 presenta una distribución homogénea.

Si sig < a 0,05 no presenta una distribución homogénea.

### Prueba de homogeneidad de varianzas

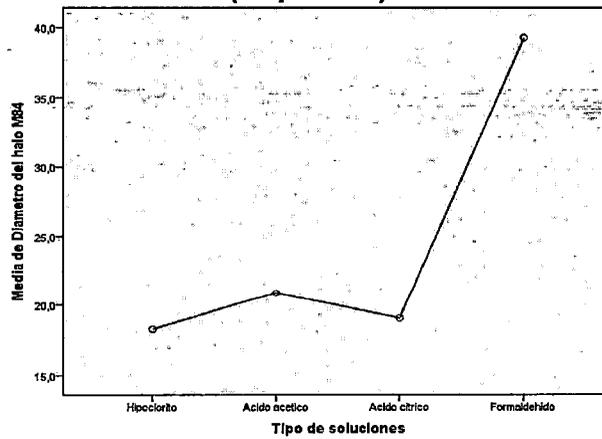
	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
<b>Diámetro del halo 84R</b>	2,072	3	34	122
<b>Diámetro del halo 99Z</b>	2,308	3	34	,094
<b>Diámetro del halo Control</b>	1,931	3	34	143

H<sub>0</sub>:  $\mu_A = \mu_B = \mu_C = \mu_D$ ; esta hipótesis nula se acepta si sig > 0,05

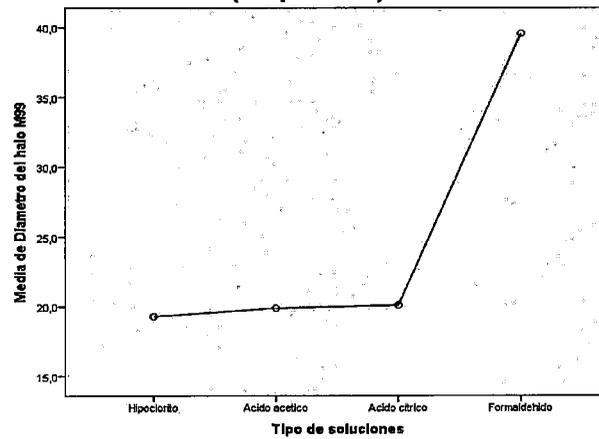
H<sub>1</sub>:  $\mu_A \neq \mu_B \neq \mu_C \neq \mu_D$ ; esta hipótesis alterna se acepta si sig < 0,05

## ANEXO N°8: DIAGRAMAS DE LA PRUEBA POST HOC PARA LA DETERMINACION DE GRUPOS HOMOGENEOS

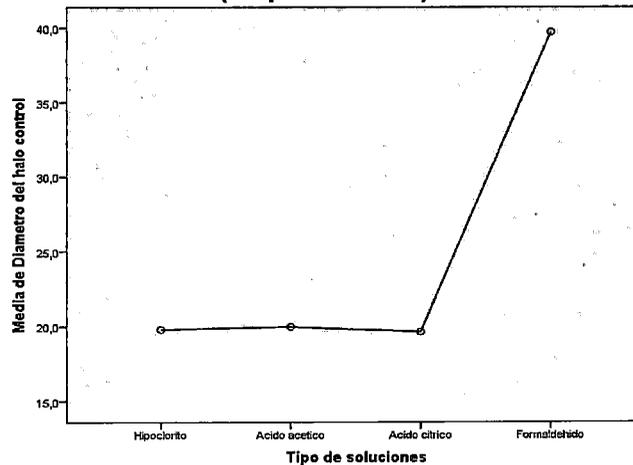
### Relación entre agentes germicidas y halo de inhibición (Cepa 84R)



### Relación entre agentes germicidas y halo de inhibición (Cepa 99Z)



### Relación entre agentes germicidas y halo de inhibición (Cepa Control)



## ANEXO N°9. DETERMINACIÓN DEL pH DE LOS AGENTES GERMICIDAS

### pH del Hipoclorito de sodio

Concentración del Hipoclorito de sodio % (v/v)	pH	Diámetro promedio
0.5	12.29	10.8
1	12.69	13.5
2	13.00	18.5
3	13.16	24.3
4	13.21	27.0

### pH del Ácido acético

Concentración del Ácido Acético % (v/v)	pH	Diámetro promedio
1	2.84	0.0
2	2.66	0.0
4	2.49	0.0
5	2.47	0.0
10	2.26	22.3
15	2.04	25.3
20	1.98	27.8
25	1.84	30.0
26	1.83	31.8
27	1.82	35.3
28	1.81	37.0
29	1.80	40.8

### pH del Ácido cítrico

Concentración del Ácido Cítrico % (p/v)	pH	Diámetro Promedio
0.5	2.52	0.0
1	2.18	0.0
2	1.91	0.0
5	1.64	12.3
10	1.47	17.3
15	1.36	21.5
20	1.34	26.3
25	1.16	28.8
26	1.14	28.3
27	1.10	29.3
28	1.08	28.5
29	1.06	29.3
30	1.03	29.0
31	1.02	29.0

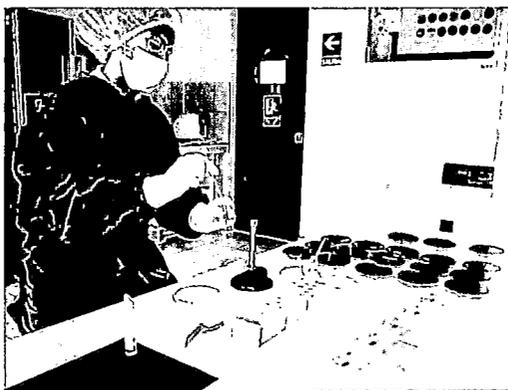
### pH del Formaldehido

Concentración del Formaldehido % (v/v)	pH	Diámetro Promedio
0.5	5.05	14.5
1	4.20	25.5
2	4.06	32.0
3	4.01	39.8
4	3.85	44.8
6	3.67	58.0
8	3.49	61.5

## ANEXO N°10. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS POR EL MÉTODO M.I.C.EVALUATOR



Se seleccionaron 2-3  
colonias de las cepas de  
*L. monocytogenes*



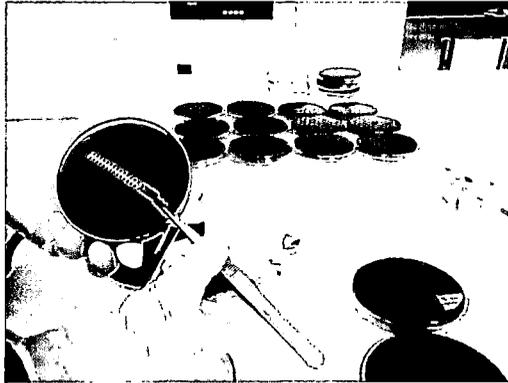
Se preparó el inóculo y  
se comparó con el  
patrón McFarland 0.5



Comparación con la  
escala McFarland 0.5.

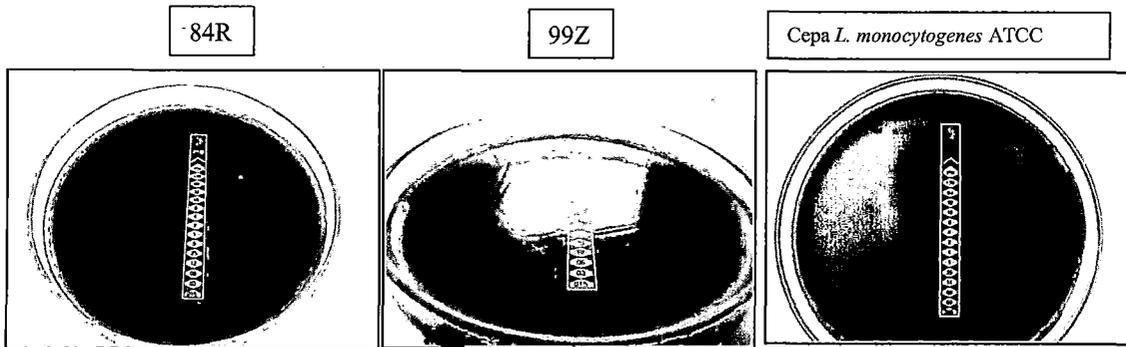


Se sembró el  
microorganismo en  
placas de agar Muller  
hinton + 5% sangre

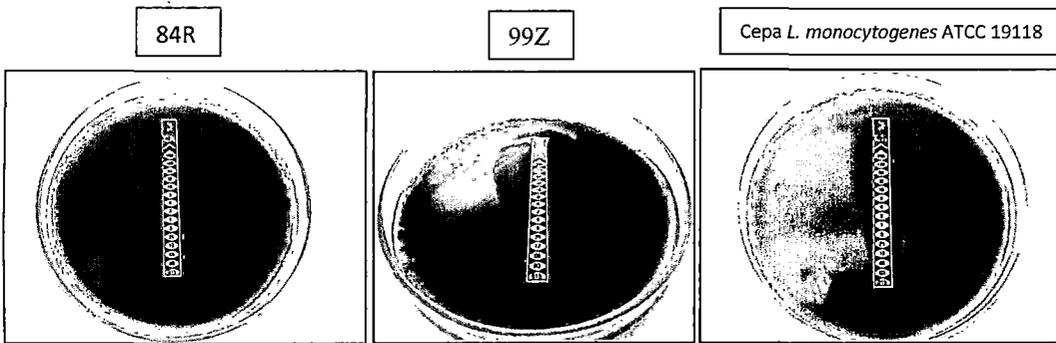


Se colocaron cuidadosamente las tiras en la superficie del agar. Se incubaron a 37°C/24 horas

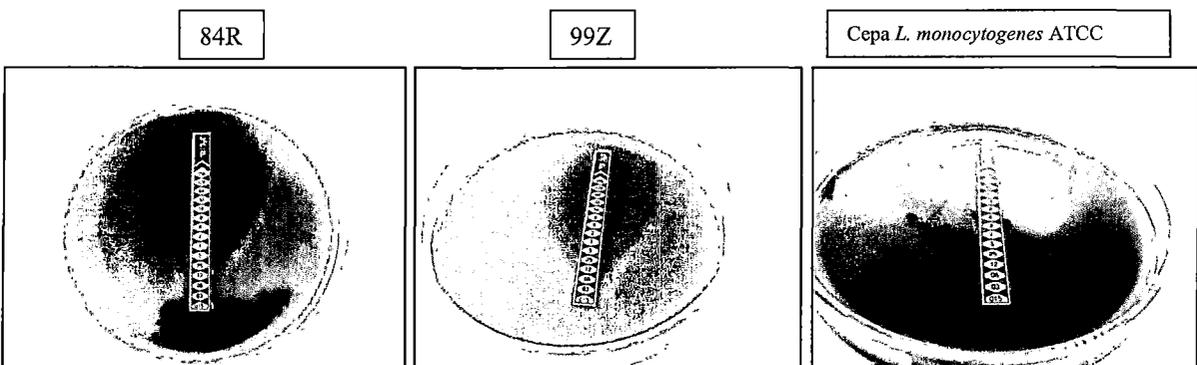
**ANEXO N°11. OBSERVACION DE LOS PUNTOS DE CORTE  
PRODUCIDOS POR LOS ANTIBIOTICOS M.I.C.EVALUATORS**



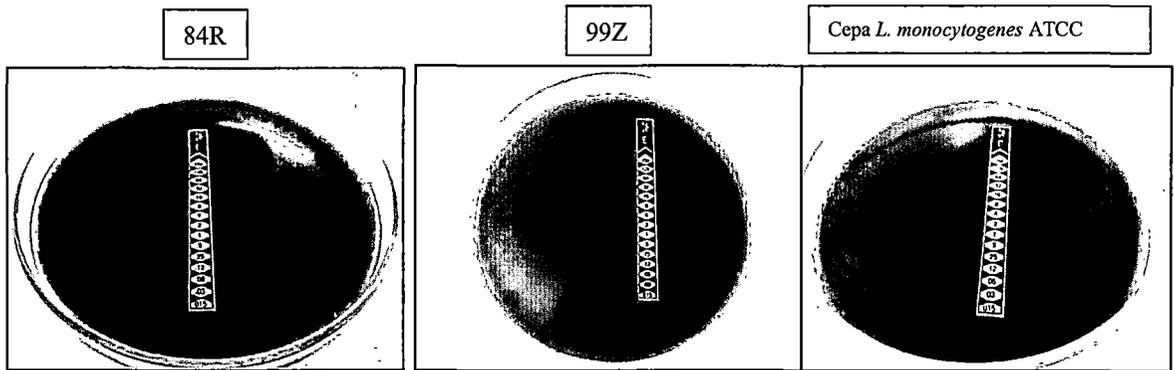
Puntos de corte ( $\mu\text{g/mL}$ ) producidos por Ampicilina en las 3 cepas de *L. monocytogenes* (84R, 99Z y patrón)



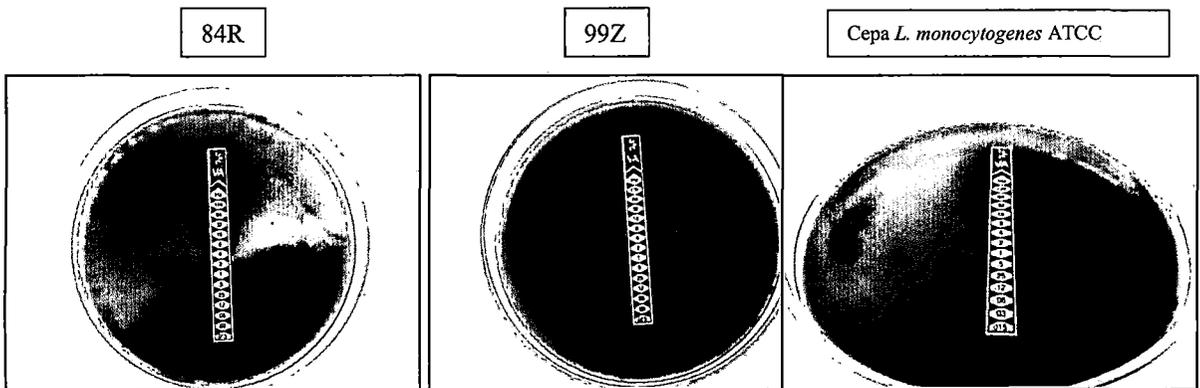
Puntos de corte ( $\mu\text{g/mL}$ ) producidos por Gentamicina en las 3 cepas de *L. monocytogenes* (84R, 99Z y patrón)



Puntos de corte ( $\mu\text{g/mL}$ ) producidos por Penicilina en las 3 cepas de *L. monocytogenes* (84R, 99Z y patrón)



Puntos de corte ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) producidos por Eritromicina en las 3 cepas de *L. monocytogenes* (84R, 99Z y patrón)



Puntos de corte ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) producidos por Vancomicina en las 3 cepas de *L. monocytogenes* (84R, 99Z y patrón)

**ANEXO N°12. FERMENTACION DE AZUCARES (API LISTERIA) DE  
LAS CEPAS 84R Y 99Z DE *Listeria monocytogenes***

Tests	Componentes activos	Coloración	Resultado
<b>DIM</b>	Sustrato enzimático	Rosa beige	Negativo
<b>ESC</b>	Esculina citrato férrico	Negro	Positivo
<b><math>\alpha</math>MAN</b>	4-nitrofenil- $\alpha$ Dmanopiranosida	Amarillo	Positivo
<b>DARL</b>	D- Arabinol	Amarillo	Positivo
<b>XYL</b>	D-Xilosa	Rojo anaranjado	Negativo
<b>RHA</b>	L-Rhamnosa	Amarillo	Positivo
<b>MDG</b>	Metil- $\alpha$ Dglucopiranosido	Amarillo	Positivo
<b>RIB</b>	D-Ribosa	Rojo anaranjado	Negativo
<b>G1P</b>	Glucosa-1 Fosfato	Rojo anaranjado	Negativo
<b>TAG</b>	D-Tagatosa	Rojo anaranjado	Negativo

**ANEXO N°13. RESOLUCIÓN MINISTERIAL N° 591-2008 “NORMA  
SANITARIA QUE ESTABLECE LOS CRITERIOS MICROBIOLÓGICOS  
DE CALIDAD SANITARIA E INOCUIDAD PARA LOS ALIMENTOS Y  
BEBIDAS DE CONSUMO HUMANO”.**

<b>XIV.2 Frutas y hortalizas frescas semiprocessadas (lavadas, desinfectadas, peladas, cortadas y/o precocidas) refrigeradas y/o congeladas.</b>						
Agente microbiano	Categoría	Clase	n	c	Límite por g	
					m	M
Aerobios mesófilos	1	3	5	3	10 <sup>4</sup>	10 <sup>6</sup>
<i>Escherichia coli</i>	5	3	5	2	10	10 <sup>2</sup>
<i>Salmonella sp.</i>	10	2	5	0	Ausencia /25 g	----
<i>Listeria monocytogenes</i> (*)	10	2	5	0	Ausencia /25 g	----

(\*) Solo para frutas y hortalizas de tierra (a excepción de las precocidas).

# ANEXO N°14. CERTIFICADO DE LA CEPA ATCC

 <p><b>ATCC</b> Product Sheet <b>Listeria monocytogenes</b> <b>(ATCC® 19118™)</b></p>	<p><b>Description</b></p> <p>Designation: LI 2109 Deposited Name: <i>Listeria monocytogenes</i> (Murray et al.) Prie Antigenic Properties: Serotype 4e</p>
<p>Please read this FIRST</p>  <p>Biosafety Level 2</p>	<p><b>Propagation</b></p> <p>Medium Medium 44; Brain Heart Infusion Agar/Brain</p> <p>Growth Conditions Temperature: 37.0°C</p>
<p><b>Intended Use</b></p> <p>This product is intended for research use only. It is not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.</p>	<p><b>Propagation Procedure</b></p> <ol style="list-style-type: none"><li>1. Open vial according to enclosed instructions.</li><li>2. Using a single tube of #44 broth (5 to 6 ml), withdraw approximately 0.5 to 1.0 ml with a Pasteur or 1.0 ml pipette. Resuspend the entire pellet.</li><li>3. Aseptically transfer this aliquot back into the broth tube. Mix well.</li><li>4. Use several drops of the suspension to inoculate a #44 agar slant and/or plate.</li><li>5. Incubate the tubes and plate at 37°C for hours.</li></ol>
<p><b>Citation of Strain</b></p> <p>If use of this culture results in a scientific publication, it should be cited in that manuscript in the following manner: <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC® 19118™)</p>	<p><b>Notes</b></p> <p>Colonies on #44 are entire, glistening, circular, smooth, raised, and translucent. Strain exhibits hemolysis on sheep blood agar.</p> <p>Additional information on this culture is available on the ATCC® web site at <a href="http://www.atcc.org">www.atcc.org</a></p>
	<p><b>References</b></p> <p>References and other information relating to this product are available online at <a href="http://www.atcc.org">www.atcc.org</a></p>
	<p><b>Biosafety Level: 2</b></p> <p>Appropriate safety procedures should always be used with this material. Laboratory safety is discussed in the current publication of the <i>Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories</i> from the U.S. Department of Health and Human Services Centers for Disease Control and Prevention and National Institutes for Health.</p>
	<p><b>ATCC Warranty</b></p> <p>The viability of ATCC® products is warranted for 30 days from the date of shipment, and is valid only if the product is stored and cultured according to the information included on this product information sheet. ATCC is the media formulation that has been found to be effective for this strain. While other, unspecified media may also produce satisfactory results, a change in media or the absence of an additive from the ATCC recommended media may affect recovery, growth and/or function of this strain. If an alternative medium formulation is used, the ATCC warranty for viability is no longer valid.</p>
<p>American Type Culture Collection PO Box 1549 Manassas, VA 20108 USA <a href="http://www.atcc.org">www.atcc.org</a></p> <p>800.618.6597 or 703.365.2700 Fax: 703.365.2703 Email: <a href="mailto:orders@atcc.org">orders@atcc.org</a></p> <p>Or contact your local distributor</p>	<p><b>Disclaimers</b></p> <p>This product is intended for laboratory research purposes only. It is not intended for use in humans. While ATCC uses reasonable efforts to include accurate and up-to-date information on this product sheet, ATCC makes no warranties or representations as to its accuracy. Citations from scientific literature and patents are provided for informational purposes only. ATCC does not warrant that such information has been confirmed to be accurate.</p> <p>This product is sent with the condition that you are responsible for its safe storage, handling, and use. ATCC is not liable for any damages or injuries arising from receipt and/or use of this product. While reasonable effort is made to insure authenticity and reliability of strains on deposit, ATCC is not liable for damages arising from the misidentification or misrepresentation of cultures.</p> <p>Please see the enclosed Material Transfer Agreement (MTA) for further details regarding the use of this product. The MTA is also available on our Web site at <a href="http://www.atcc.org">www.atcc.org</a></p>
<p>Page 1 of 2</p>	<p>Additional information on this culture is available on the ATCC web site at <a href="http://www.atcc.org">www.atcc.org</a>. © ATCC 2013. All rights reserved. ATCC is a registered trademark of the American Type Culture Collection, (01/14)</p>