

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



DETERMINACION DE LA RESISTENCIA EN CEPAS DE *Listeria monocytogenes* AISLADA A PARTIR DE MUESTRAS DE ESPINACA *Spinacea oleracea* UTILIZANDO GERMICIDAS PARA LA DESINFECCION DE ALIMENTOS

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

NURIAN LISSETH PEREZ ESCOBAR

MELBA PATRICIA SIGARAN ALVARADO

PARA OPTAR AL GRADO DE

LICENCIATURA EN QUIMICA Y FARMACIA

SEPTIEMBRE, 2012

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTROAMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

ING. ROBERTO NIETO LOVO

SECRETARIO GENERAL

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. ANABEL DE LOURDES AYALA DE SORIANO

SECRETARIO

LIC. FRANCISCO REMBERTO MIXCO LÓPEZ

COMITÉ DE TRABAJO DE GRADUACION

COORDINADORA GENERAL

LIC. MARÍA CONCEPCIÓN ODETTE RAUDA ACEVEDO

ASESORES DE ÁREA DE MICROBIOLOGIA

MSC. CORALIA DE LOS ANGELES GONZÁLEZ DE DÍAZ

ASESORES DE ÁREA DE GESTION AMBIENTAL; CALIDAD AMBIENTAL

MSC. CECILIA HAYDEE GALLARDO DE VELÁSQUEZ

DOCENTE DIRECTORA

MSC. MARÍA EVELYN SÁNCHEZ DE RAMOS

AGRADECIMIENTOS

Primero y antes que nada agradecemos a Dios por estar presente en cada paso que damos, por fortalecer nuestro corazón e iluminar nuestra mente y por haber puesto en nuestro camino a aquellas personas que han sido soporte y compañía durante este periodo de estudio.

Los más profundos y sinceros agradecimientos a nuestra docente directora: MSc. María Evelyn Sánchez de Ramos. Por su valiosa asesoría en la coronación de este humilde trabajo.

A nuestras asesoras de área MSc Coralia de los Ángeles González de Díaz, MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velázquez y Licda. Odette Rauda coordinadora de trabajos de graduación, por los consejos recibidos y su ayuda en la culminación de este trabajo.

Al laboratorio de control de calidad microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), por habernos prestado sus instalaciones ya que sin estas no se hubiera podido realizar esta investigación.

A todas las personas que colaboraron con su apoyo en la realización de este trabajo de graduación sin esperar recompensa alguna más que la bendición del todopoderoso.

Nurian Pérez y Melba Sigarán

DEDICATORIA

La culminación de este trabajo se la dedico en primer lugar a Dios por su compañía a lo largo de mi vida, porque todo lo que tengo y soy es gracias a él.

A mi Mami, Juana Lucia Escobar por su confianza, apoyo y sacrificio para yo poder terminar mis estudios.

A mi Papi, Manuel Vicente Pérez por su apoyo y cariño.

A mis hermanos, Sureya y Franklin por su cariño y confianza y a María de los Ángeles que desde el cielo nos cuida.

A mi compañera de tesis Paty por su comprensión, paciencia y amistad que me ha brindado durante todos estos años.

Nurian Lisseth Pérez Escobar

DEDICATORIA

A Dios por estar conmigo siempre y por darme a los mejores padres del mundo.

A mi mami Melba Edis Alvarado y a mi papi Elmer Joaquín Sigarán este triunfo también es de ustedes, gracias por su apoyo, trabajo, esfuerzo, dedicación, amistad y sobre todo por su amor. GRACIAS ¡¡¡¡LOS AMO!!!!

A mi querido hermano Rafael Antonio por su apoyo y cariño, por creer en mí y estar conmigo siempre, a Eduardito y Belen. LOS QUIERO MUCHO.

A mí querida tía Gloria por su apoyo y cariño, a mis primos: Guillermo y Santia que los quiero como mis hermanos, gracias por estar siempre a mi lado

A mi amiguita y compañera de tesis Nurian Lisseth Pérez Escobar por su amistad, cariño, paciencia, perseverancia, consejos, risas, llantos, apoyo incondicional, y por todos los momentos que pasamos juntas, mil gracias.

TE QUIERO MUCHO!!!!

Melba Patricia Sigarán Alvarado

INDICE

| | Pág. |
|---|-------|
| Resumen | |
| Capítulo I | |
| 1.0 Introducción | xviii |
| Capítulo II | |
| 2.0 Objetivos | |
| Capítulo III | 22 |
| 3.0 Marco Teórico | 23 |
| 3.1 Inocuidad de alimentos | 23 |
| 3.2 Definición botánica de hortalizas | 24 |
| 3.3 Clasificación de hortalizas | 24 |
| 3.4 Generalidades de la hortaliza en estudio | 25 |
| 3.4.1 Descripción de <i>Spinace aoleracea</i> (espinaca) | 25 |
| 3.4.2 Composición química de la espinaca | 26 |
| 3.4.3 Propiedades de la espinaca | 28 |
| 3.5 Generalidades de <i>Listeria monocytogenes</i> | 28 |
| 3.5.1 Caracterización de <i>Listeria monocytogenes</i> | 29 |
| 3.5.2 Patogénesis | 30 |
| 3.5.3 Ciclo infeccioso de <i>Listeria monocytogenes</i> | 31 |
| 3.5.4 Fundamento de pruebas bioquímicas para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> | 34 |
| 3.5.4.1 Pruebas bioquímicas | 34 |
| 3.5.4.2 Prueba de hemólisis | 36 |
| 3.5.4.3 Prueba CAMP | 36 |
| 3.5.5 Listeriosis | 37 |

| | |
|---|----|
| 3.5.6 Cuadro clínico de Listeriosis | 38 |
| 3.5.7 Listeriosis durante el embarazo | 38 |
| 3.5.8 Tratamiento | 39 |
| 3.5.9 Epidemiología | 41 |
| 3.6 Definición de germicidas | 43 |
| 3.7 Generalidades de germicidas | 43 |
| 3.7.1 Características de un germicida ideal | 44 |
| 3.7.2 Clasificación de germicidas | 44 |
| 3.7.3 Hipoclorito de sodio | 45 |
| 3.7.4 Ácido Láctico | 46 |
| 3.7.5 Ácido Acético | 46 |
| 3.7.6 Yodo | 47 |
| 3.8 Resistencia microbiana | 48 |
| 3.9 Kirby Bauer modificado | 49 |
| | |
| Capítulo IV | 51 |
| 4.0 Diseño Metodológico | 52 |
| 4.1 Tipo de estudio | 52 |
| 4.2 Investigación bibliográfica | 52 |
| 4.3 Investigación de campo | 52 |
| 4.4 Parte experimental | 55 |
| 4.4.1 Enriquecimiento de la muestra | 55 |
| 4.4.2 Aislamiento de <i>Listeria</i> | 55 |
| 4.4.3 Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> | 56 |
| 4.4.3.1 Catalasa | 56 |
| 4.4.3.2 Hemólisis | 56 |
| 4.4.3.3 Movilidad | 56 |
| 4.4.3.4 TSI | 57 |

| | |
|--|----|
| 4.4.3.5 Reacción de Voges Proskauer | 57 |
| 4.4.3.6 Reacción de indol | 57 |
| 4.4.3.7 Prueba de rojo de metilo | 58 |
| 4.4.3.8 Prueba CAMP | 58 |
| 4.4.4 Determinación de la resistencia por el método Kirby Bauer modificado | 58 |
| 4.4.4.1 Método Kirby Bauer modificado | 58 |
| 4.4.4.2 Patrón de comparación (yodo) | 60 |
| Capítulo V | 61 |
| 5.0 Resultados y Discusión de resultados | 62 |
| 5.1 Guía de Observación | 62 |
| 5.2 Aislamiento | 70 |
| 5.3 Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> | 70 |
| 5.4 Resistencia por el método Kirby Bauer modificado | 73 |
| Capítulo VI | 83 |
| 6.0 Conclusiones | 84 |
| Capítulo VII | 85 |
| 7.0 Recomendaciones | 86 |
| Bibliografía | |
| Anexos | |

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos N°

1. Mapa de ubicación del Mercado La Tiendona
2. Guía de Observación de puestos que comercializan espinaca en el Mercado La Tiendona
3. Esquemas de procedimientos: tratamiento de muestra
4. Normativa para *Listeria monocytogenes* según Reglamento Técnico Centroamericano
5. Medidas de halos de inhibición producidas por la solución de yodo 2% frente a *Listeria monocytogenes* cepa ATCC 18952
6. Simbología de resultado de pruebas realizadas.
7. Resultado de identificación de *Listeria monocytogenes* en los muestreos realizados
8. Tablas de halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de las muestras analizadas
9. Tablas de sensibilidad de cepas aisladas de *Listeria monocytogenes* frente a germicidas de prueba
10. Enriquecimiento y aislamiento de *Listeria monocytogenes* en medios selectivos
11. Identificación de *Listeria monocytogenes*
12. Prueba de sensibilidad para las cepas de *Listeria monocytogenes* por el método de Kirby Bauer modificado
13. Preparación de medios de cultivo utilizados y su composición

INDICE DE FIGURAS

| Figura N° | Pág |
|---|-----|
| 1. Hojas de <i>Spinacea oleracea</i> | 25 |
| 2. Morfología de <i>Listeria monocytogenes</i> | 29 |
| 3. Ciclo de infección de <i>Listeria monocytogenes</i> | 31 |
| 4. Gráfico de los puestos del mercado La Tiendona que cuentan con agua potable | 62 |
| 5. Gráfico de los puestos del mercado La Tiendona que cuentan con sistema de drenaje | 63 |
| 6. Gráfico de los puestos del mercado La Tiendona que cuentan con depósitos de desecho | 64 |
| 7. Gráfico de los tipos de depósitos en que se exhibe el alimento (espinaca) para su comercialización | 65 |
| 8. Gráfico de los tipos de protección que se le da al producto para protegerlo de factores externos | 66 |
| 9. Gráfico del tipo de almacenamiento que se le da al producto para mantenerlo fresco | 67 |
| 10. Gráfico del tipo de vestimenta del comerciante en los puestos de venta | 68 |
| 11. Gráfico de puestos en los que se observó si rocían con algún producto químico el alimento durante su comercialización | 69 |
| 12. Gráfica del porcentaje de identificación de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> | 70 |
| 13. Grafica de susceptibilidad de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> al Hipoclorito de sodio 1% | 75 |
| 14. Grafica de susceptibilidad de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> al Hipoclorito de sodio 2% | 76 |

| | |
|--|----|
| 15. Grafica de susceptibilidad de cepas de Listeria monocytogenes al Ácido láctico 1% | 77 |
| 16. Grafica de susceptibilidad de cepas de Listeria monocytogenes al Ácido láctico 2% | 78 |
| 17. Grafica de susceptibilidad de cepas de Listeria monocytogenes al Ácido acético 4% | 78 |
| 18. Grafica de susceptibilidad de cepas de Listeria monocytogenes al Ácido acético 5% | 79 |
| 19. Gráfico de porcentaje de cepas de Listeria monocytogenes resistentes a los germicidas de prueba | 80 |
| 20. Grafica de porcentaje de cepas de Listeria monocytogenes resistente a múltiples germicidas | 81 |

ÍNDICE DE TABLAS

| Tabla N° | Pág |
|---|------------|
| 1. Composición química porcentual de la espinaca | 27 |
| 2. Puestos del mercado la Tiendona que cuentan con agua potable | 62 |
| 3. Puestos del mercado La Tiendona que cuentan con sistema de drenaje | 63 |
| 4. Puestos del mercado La Tiendona que cuentan con depósito de desecho | 63 |
| 5. Tipo de depósito en el que exhiben el alimento (espinaca) para su comercialización. | 64 |
| 6. Tipo de protección que se le da al producto para protegerlo de factores externos | 66 |
| 7. Tipo de almacenamiento que se le da al producto para mantenerlo fresco | 66 |
| 8. Vestimenta del comerciante en los puestos de venta | 67 |
| 9. Porcentaje de puestos en los que se observó si rocían con algún producto químico el alimento durante su comercialización | 68 |
| 10. Resultado de Pruebas Bioquímicas del total de muestras | 71 |
| 11. Resultado de otras pruebas de identificación del total de muestras | 72 |

12. Promedio de diámetros de halos de inhibición (mm) 74
producidos por los germicidas de prueba y la solución
patrón frente a las cepas de *Listeria monocytogenes*
aisladas del total de muestras y de la cepa control
ATCC 18952
13. Porcentaje de cepas de *Listeria monocytogenes* 81
resistentes a múltiples germicidas.

RESUMEN

En la presente investigación se realizó el aislamiento de cepas de *Listeria monocytogenes* a partir de muestra de espinaca *Spinacea oleracea* comercializadas en el Mercado de Mayoreo La Tiendona para posteriormente determinar la resistencia microbiana de estas cepas frente a tres germicidas utilizados en la desinfección de alimentos a diferentes concentraciones Hipoclorito de sodio 1 y 2%, Ácido Láctico 1 y 2% y Ácido acético 4 y 5 %.

Inicialmente se realizó una guía de observación para describir las condiciones higiénicas durante la comercialización de la espinaca, y según los resultados se observó que los puestos en estudio donde se comercializa la hortaliza no cumplen con las condiciones mínimas higiénicas para la comercialización del producto, factor que influye en la calidad e higiene del alimento.

Para el aislamiento de las cepas las muestras se enriquecieron en Caldo de Enriquecimiento para Listeria (LEB) por 48 horas, luego se inocularon en agares selectivos para Listeria OXFORD y PALCAM. Para la identificación de las cepas se realizaron pruebas bioquímicas (citrato, triple azúcar hierro, movilidad, rojo de metilo, VogesProskauer e indol), prueba catalasa, prueba Christie, Atkins, Munch-Petersen CAMP y tinción al Gram, encontrándose que el 100% de las muestras analizadas contenían cepas del genero *Listeria spp* mientras que solo el 71% de estas presentaron contaminación con *Listeria monocytogenes* por lo que estas muestras no cumplen con la especificación del Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) el cual indica ausencia de *Listeria monocytogenes* en este tipo de alimentos.

La resistencia de las cepas aisladas se determinó por medio del Método Kirby Bauer Modificado utilizando como patrón de referencia solución de yodo al 2%, cada muestra se trabajó por duplicado y se llevó como control positivo una cepa de ***Listeria monocytogenes*** ATCC 18952.

El 82.35% de las cepas aisladas presentaron resistencia al Hipoclorito de sodio 1%, 21.41% al Hipoclorito de sodio 2%, 52.94% al Ácido Láctico 1%, 5.88% a Ácido Láctico 2%, y ninguna de las cepas mostró resistencia a Ácido Acético 4% y 5 % por lo que se concluye que el Ácido láctico al 2%, Ácido Acético 4% y 5 % pueden ser utilizados en la industria alimentaria para la eliminación de ***Listeria monocytogenes*** y el aumento de resistencia que las cepas presentaron frente a Hipoclorito de sodio 1% y 2% y Ácido Láctico 1% se debe al uso indiscriminado de germicidas, ocasionando tolerancia a la bacteria.

Se recomienda la continuidad de este tipo de estudio tomando en cuenta factores como la presencia de materia orgánica y la variación de las concentraciones de los germicidas de prueba, además se debe mejorar las condiciones higiénicas tanto de los puestos de venta como de los comerciantes del mercado para reducir la contaminación de este alimento por ***Listeria monocytogenes***, y según los resultados se pueden usar Ácido láctico 2% y Ácido acético 4 y 5% para la eliminación del microorganismo de la espinaca y otros vegetales que se consumen crudos.

La parte experimental se llevó a cabo en el Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud CENSALUD en el periodo de mayo-junio de 2012.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Las Enfermedades transmitidas por alimentos causadas por *Listeria monocytogenes* 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); debido al auge que han tenido, la gravedad y los múltiples daños que la Listeriosis causa al ser humano principalmente en poblaciones más susceptibles como niños recién nacidos, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunodeprimidas. Esto se debe a que *Listeria monocytogenes* es una bacteria capaz de sobrevivir e incluso multiplicarse en ambientes variados y hostiles, como a elevadas temperaturas, congelación, presencia de sales y productos químicos, esta capacidad de supervivencia la hace difícil de eliminar y facilita el desarrollo de resistencia ante los variados procesos de desinfección.

Uno de los alimentos en los que *Listeria monocytogenes* se encuentra difundida es en la espinaca, una hortaliza consumida a nivel mundial debido a los beneficios que aporta a la salud, la presencia de este microorganismo en la espinaca puede desviar la función original de proporcionar beneficios a la salud, convirtiéndola en el vehículo transmisor de Listeriosis.

La eliminación de este microorganismo de la espinaca para evitar el desarrollo de la enfermedad es un problema grave, tornándose más difícil cuando la bacteria ha adquirido resistencia a agentes germicidas.

Es por ello que el desarrollo de esta investigación pretendió determinar la resistencia de *Listeria monocytogenes* frente a germicidas que son de uso común para la limpieza y desinfección de alimentos como la espinaca.

Para esta investigación primero se realizó una guía de observación para conocer las condiciones higiénicas en la comercialización de espinaca en los puestos de venta del mercado La Tiendona.

Posteriormente se identificaron cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de muestras de espinaca recolectadas en el mercado de mayoreo La Tiendona. Estas muestras se trataron en medios de enriquecimientos, inoculación en medios selectivos, tinción al Gram y su identificación se logró empleando métodos tradicionales como: prueba Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP), pruebas bioquímicas, catalasa y prueba de hemólisis.

Finalmente se determinó la resistencia de *Listeria monocytogenes* a germicidas usados en la desinfección de alimentos, utilizando el método Kirby Bauer modificado, de igual forma se evaluó la resistencia microbiana que existe entre los germicidas seleccionados ante *Listeria monocytogenes* ATCC 18952 cepa control.

Los desinfectantes evaluados fueron Ácido láctico 1% y 2%, Ácido acético 4% y 5%, hipoclorito de sodio 1% y 2%.

Los análisis se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de alimentos en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el periodo de mayo – junio de 2012.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* aislada a partir de muestras de espinaca *Spinacea oleracea* utilizando germicidas para la desinfección de alimentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

2.2.1 Describir las condiciones higiénicas actuales en la comercialización de espinaca en los puestos de venta del mercado La Tiendona a través de una guía de observación.

2.2.2 Aislar el microorganismo *Listeria spp.* en muestras de espinaca recolectadas en diferentes puestos del mercado de mayoreo La Tiendona.

2.2.3 Identificar *Listeria monocytogenes* obtenida de muestras de espinaca a partir de un cultivo puro

2.2.4 Comprobar la resistencia microbiana que existe entre los germicidas seleccionados ante *Listeria monocytogenes* cepa ATTC 18952 (control).

2.2.5 Evaluar la resistencia microbiana de *Listeria monocytogenes* aislada de muestras de espinacas ante tres germicidas de prueba a diferentes concentraciones (Ácido láctico 1% y 2%, Hipoclorito de sodio 1% y 2% y Ácido acético 4% y 5%)

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 INOCUIDAD DE ALIMENTOS.

La contaminación de alimentos tiene grandes repercusiones para la salud pública, las economías de los países y el comercio de estos productos. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) constituyen un problema muy expandido y creciente de salud pública en el mundo ya que millones de personas enferman y muchas mueren por consumir alimentos insalubres afectando principalmente a niños, embarazadas y personas de edad.

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos pueden generarse a partir de un alimento o de agua contaminada. Son llamadas así porque el alimento actúa como vehículo de transmisión de organismos dañinos y sustancias tóxicas.

De acuerdo a los datos del Sistema Regional de Información sobre Vigilancia Epidemiológica de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIRVETA) coordinado por el Instituto Panamericano de Protección de Alimentos y Zoonosis (INPPAZ) de la Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS) en los años 1993 y 2002 se reportaron 6930 brotes de ETA en países de América, dicha cifra en los últimos años ha sido superada en gran medida debido a la globalización creciente de los mercados, el crecimiento de la industria agroalimentaria y los cambios en los patrones de consumo. ⁽²⁴⁾

Por tal razón la Organización Mundial de la Salud (OMS) manifiesta que la inocuidad de los alimentos engloba acciones encaminadas a garantizar la máxima seguridad posible de los alimentos.

Las políticas y actividades que persiguen dicho fin deberán de abarcar toda la cadena alimenticia, desde la producción al consumo.

De acuerdo a lo establecido por el Codex Alimentarius, la inocuidad es la garantía de que un alimento no causará daño al consumidor cuando el mismo sea preparado o ingerido de acuerdo con el uso a que se destine. (5)

3.2 DEFINICIÓN BOTANICA DE HORTALIZAS

Las hortalizas son aquellas verduras y demás plantaciones comestibles que se cultivan generalmente en huertas y que mayormente se las consume como alimentos, ya sea de manera cruda o preparada culinariamente (7)

3.3 CLASIFICACIÓN DE HORTALIZAS

-Según la parte de la planta comestible

1. Frutos: Berenjena, pimiento , tomate, guindillas, calabaza
2. Bulbos: cebolla, puerro, ajo
3. Hojas y tallos verdes: espinaca, perejil, apio, col, brócoli, coles de bruselas, lechuga.
4. Flores: alcachofa, coliflor.
5. Tallos jóvenes: esparrago
6. Legumbres frescas o verdes: guisantes, habas, judías verdes
7. Raíces: zanahoria, nabo, remolacha, rábano

3.4 GENERALIDADES DE LA HORTALIZA EN ESTUDIO

3.4.1 DESCRIPCION DE *Spinacea oleracea* (ESPINACA)



Figura N°1 Hojas de *Spinacea oleracea*

Spinacea oleracea es una planta cultivada en varias partes del mundo debido a las propiedades nutritivas que posee, pertenece a la familia de las Quenopodiáceas.⁽¹⁶⁾

Es una de las plantas de mayor consumo a nivel mundial debido a los beneficios que esta aporta a la salud y su fácil ingesta ya que puede formar parte de diversos platos en la cocina, ya sea cruda o cocinada.

La planta de espinaca crece en diferentes climas alcanza un tamaño de 35-90 cm de longitud, las hojas crecen en primera instancia como una roseta, estas son pecioladas, de un color verde oscuro y presentan una leve consistencia carnosa.

Posteriormente se desarrolla el tallo surgiendo desde las rosetas de las hojas en forma erecta y en este se sitúan las flores. ⁽¹⁶⁾

La raíz es pivotante, poco ramificada y desarrollo radicular superficial.

La espinaca tiene flores masculinas, femeninas y hermafroditas. Las masculinas agrupadas en números de seis a doce en las espigas terminales o axilares presentan color verde y están formadas por un periantio con cuatro a cinco pétalos y cuatro estambres. Las flores femeninas se reúnen en glomérulos axilares y están formadas por un periantio bidentado o tetradentado con óvulos uniovulares, estilo único y estigma dividido en tres a cinco segmentos.⁽⁹⁾

3.4.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA ESPINACA

La espinaca es una de las hortalizas que posee mayor cantidad de sustancias nutricionales es por eso que comparada con otras esta es la más completa.

Su principal componente es el agua. Contiene una alta cantidad de vitamina K, además presenta una importante cantidad de otras vitaminas, principalmente de la B, C y E.

Las hojas de la planta, poseen fibra, que facilitan la realización de los procesos digestivos. Debido a esto la espinaca posee propiedades medicinales digestivas.

Esta planta posee entre sus componentes, ácidos grasos no saturados, destacándose el oleico y el linoleico. Estos son los responsables de que la espinaca estimule el buen funcionamiento del aparato circulatorio. Además, contiene una importante cantidad de ácido oxálico.

Es rica en sales minerales como hierro, calcio, fósforo, potasio, zinc, entre otros. ⁽²⁷⁾

Tabla N°1. Composición química porcentual de la espinaca

| Composición de la espinaca por cada 100 gramos | | |
|--|-----------|-----------|
| | Crudas | Hervidas |
| Agua | 92.2 g | 94.5 g |
| Calorías | 22.0 Kcal | 16.0 Kcal |
| Grasa | 0.30 g | 0.2 g |
| Proteínas | 2.20 gr | 1.7 g |
| Hidratos de carbono | 3.90 g | 2.8 g |
| Fibra | 2.8 g | 2.0 g |
| Potasio | 449.0 mg | 285.0 mg |
| Calcio | 210.0 mg | 158.0 mg |
| Fosforo | 28.0 mg | 18.0 mg |
| Sodio | 21.0 mg | 14.0 mg |
| Magnesio | 11.0 mg | 7.0 mg |
| Hierro | 1.5 mg | 0.8 mg |
| Zinc | 0.17mg | 0.11 mg |
| Vitamina C | 130.0 mg | 65.0 mg |
| Vitamina B2 | 0.09 mg | 0.09 mg |
| Vitamina B6 | 0.153 mg | 0.248 mg |
| Vitamina A | 9900.0 IU | 8200.0 IU |
| Vitamina E | 1.7 mg | - |
| Folato | 159.0mcg | 73.0mcg |
| Niacina | 0.67 mg | 0.43 mg |

3.4.3 PROPIEDADES DE ESPINACA

- Antioxidante
- Digestiva
- Diurética
- Elimina el colesterol
- Ayuda al sistema circulatorio

3.5 GENERALIDADES DE *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es una bacteria patógena para el ser humano cuya infección principalmente se produce por la vía alimentaria, se implicó como agente etiológico en las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) a partir de los años 80.(1)

Listeria monocytogenes está ampliamente difundida en la naturaleza. Su presencia en los alimentos está determinada por su extensa distribución en el ambiente, tierra, aguas servidas, materia fecal, vegetación, ensilados y entorno de la producción de alimentos lo que confiere una importante oportunidad para contaminarlos.

Este microorganismo se describió por primera vez en 1926 por Murray, Webb, Swann como *Bacterium monocytogenes* debido a una epizootia en conejos y cobayos de laboratorio que se caracterizaba por monocitosis, pero hasta en 1957 el alemán Heinz Seeliger impuso el nombre *Listeria monocytogenes*, que se utiliza hasta hoy.(3)

3.5.1 CARACTERIZACIÓN DE *Listeria monocytogenes*

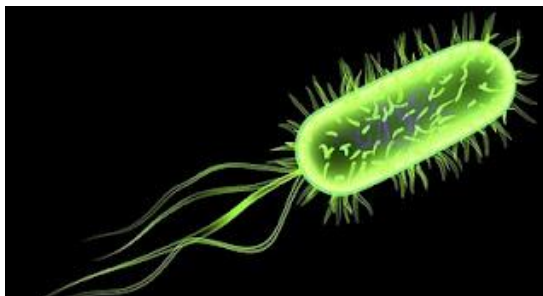


Figura N°2 Morfología de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes pertenece al género listeria, el cual se caracteriza por ser bacilos Gram positivos, anaerobios facultativos, cortos no esporulados ni ramificados. Es móvil a 25°C pero inmóvil a 37°C por inactivación de flagelos. Sus colonias son pequeñas translúcidas y grises y la mayor parte de la cepas produce una zona estrecha de β hemólisis alrededor de las colonias.⁽⁶⁾

Esta bacteria tiene la capacidad de desarrollarse a temperatura entre – 0.4 y 45 °C es decir que puede crecer a temperaturas de refrigeración. Son psicótrofos, catalasa positiva y oxidasa negativa. El ensayo de Chirstie, Atkins, Munich-Petersen (CAMP) estimula la producción de hemolisina y es tolerante a concentraciones elevadas (10%) de cloruro de sodio.

El género *Listeria* concentra numerosas especies: *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria grayi* y *Listeria monocytogenes*; solo esta última se ha mostrado patógena al hombre. ⁽²³⁾

3.5.2 PATOGÉNESIS

Listeria monocytogenes se puede encontrar en suelos, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos, insuficientemente cocidos y procesados, queso, leche no procesada, mariscos y vegetales. Debido a su amplia distribución, este microorganismo tiene muchas oportunidades de contaminar los alimentos siendo ésta la vía más frecuente por la que la bacteria entra al organismo humano. (26)

Este microorganismo tiene la capacidad de atravesar la placenta, estableciendo la única vía de transmisión interhumana, además ***Listeria monocytogenes*** afecta la piel y el globo ocular siendo los más propensos aquellas personas que tienen contacto directo con tejidos o animales contaminados.(26,37)

La patogenicidad de ***Listeria monocytogenes*** se debe a la capacidad para adherirse, invadir y multiplicarse dentro de una gran variedad de células fagocíticas (enterocitos, hepatocitos, fibroblastos, células endoteliales y células dendríticas).

La capacidad del microorganismo para penetrar en el citoplasma de la célula, proliferar y diseminarse a las células adyacentes es esencial para la expresión plena de su potencial patogénico.

Su unión a la célula huésped se produce por una proteína (integrina), luego es fagocitada por la célula huésped. En el fagolisosoma es sometida a un ambiente hostil con pH y ferritina bajo, activando una exotoxina (listeriolisina O) que es capaz de lisar la membrana del fagolisosoma en 30 minutos y escapar al citoplasma.

La listeriolisina O exotoxina hemolítica y citolítica es un factor crítico de virulencia de ***Listeria monocytogenes***.

La toxina se une al colesterol e interrumpe las membranas y tal vez es el factor que conduce a una interrupción de las membranas fagolisosómicas y a un crecimiento sin restricciones de *Listeria* dentro del citoplasma del fagocito. ***Listeria*** se disemina célula a célula sin ponerse en contacto con el medio extracelular, lo que explica la necesidad de una inmunidad mediada por células.

Puesto que la bacteria nunca es extracelular los anticuerpos humorales del huésped no serían efectivos.(37)

3.5.3 CICLO INFECTIVO DE *Listeria monocytogenes*

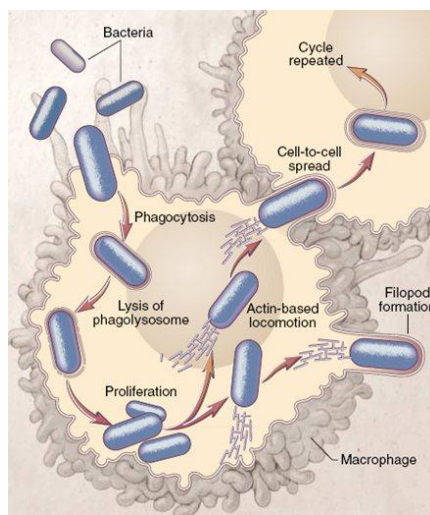


Figura N° 3 Ciclo de infección de ***Listeria monocytogenes***

Listeria monocytogenes es un parásito intracelular facultativo que penetra en el hospedador a través del sistema digestivo. Una vez dentro del organismo lleva a cabo su ciclo infeccioso en 4 etapas:

- Entrada a las células 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 ***Listeria 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 ***Listeria monocytogenes*** en la célula.

Mientras que en la vía de internalización mediada por las internalinas B está basada 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.

- 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 tiol-activada listeriolisina O (LLO) responsable de su capacidad de invasión y virulencia, ya que le permite escapar desde el fagosoma hacia el citoplasma. ***Listeria 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.

- Desplazamiento intracitoplasmático

El movimiento intracelular tiene lugar como consecuencia de un ensamblaje direccional de monómeros de actina de la célula hospedadora en uno de los polos de la bacteria, fenómeno aparentemente 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 ***Listeria monocytogenes*** transite en el ambiente intracelular a velocidades de 0.05 a 0.3 $\mu\text{m}/\text{seg}$.

- Diseminación célula a célula.

La polimerización polar de actina propulsa a ***Listeria monocytogenes*** por el citoplasma en un movimiento aleatorio que hace que finalmente algunas bacterias alcancen la periferia de la célula infectada. Allí éstas entran en contacto con la membrana celular, haciendo protrusión hacia la célula colindante provocando que produzca prolongaciones alargadas filópodos o protrusiones 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 patogénesis de la infección por ***Listeria monocytogenes***. (14, 34,12)

3.5.4 FUNDAMENTO DE PRUEBAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Listeria monocytogenes*.

3.5.4.1 PRUEBAS BIOQUIMICAS

Las pruebas bioquímicas consisten en distintos test químicos aplicados a medios biológicos, los cuales, conocida su reacción, nos permiten identificar distintos microorganismos presentes.

Su sistema de funcionamiento generalmente consiste en determinar la actividad de una vía metabólica a partir de un sustrato que se incorpora en un medio de cultivo y que la bacteria al crecer incorpora o no.

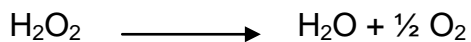
Para la realización de las pruebas bioquímicas se dispone de múltiples medios, los cuales se deben aplicar de acuerdo a las exigencias del microorganismo en estudio.

Dentro de las pruebas bioquímicas están:

- PRUEBA DE LA CATALASA

El objetivo es buscar la presencia de la enzima catalasa.

El peróxido de hidrógeno se produce al utilizar la bacteria al azúcar por vía oxidativa. Al ser este un compuesto muy oxidante las bacterias la eliminan mediante la producción de la enzima catalasa.



- PRUEBA CITRATO

La utilización de citrato como única fuente de carbono se detecta en un medio de cultivo con citrato como única fuente de carbono mediante el crecimiento y la

alcalinización del medio. Este aumento de pH se visualiza con el indicador azul de bromotimol que vira al alcalino a pH 7,6

- PRUEBA TSI (TRIPLE AZUCAR HIERRO)

El TSI es un medio nutriente y diferencial que permite estudiar la capacidad de producción de ácido y gas a partir de la glucosa, sacarosa y lactosa en un único medio. También permite la identificación de la producción de H₂S a partir de sustancias orgánicas que contiene el azufre.

- PRUEBA MIO (MOVILIDAD-INDOL-ORNITINA)

Esta prueba bioquímica permite identificar bacterias de acuerdo a su motilidad a la reacción del Indol a la descarboxilación de la ornitina.

- ROJO DE METILO

El rojo de metilo es un indicador de pH con un intervalo entre 6,0 (amarillo) y 4,4 (rojo), que se utiliza para visualizar la producción de ácidos por la vía de fermentación de la glucosa ácido mixta, en la cual se forman fundamentalmente ácido láctico, acético y succínico, además de etanol, H₂ y CO₂.

- VOGUES PROSKAUER

En esta prueba se determina la vía de fermentación de la glucosa del 2,3 butanodiol. El acetil-metil-carbinol (acetoína) es un producto intermediario en la producción de butanodiol. En medio alcalino y en presencia de oxígeno la acetoína es oxidada a diacetilo. Este se revela en presencia de alfa-naftol dando un color rojo-fucsia.

En esta vía se forman cantidades menores de ácido (acetato y succinato) y los principales productos son el butanodiol, etanol, H₂ y CO₂

- INDOL

El indol es uno de los productos de degradación metabólica del aminoácido triptófano. Las bacterias que poseen la triptofanasa son capaces de hidrolizar y desaminar el triptófano con producción de indol, ácido pirúvico y amoniaco. La producción de indol es una característica importante para la identificación de muchas especies de microorganismos.

Esta prueba está basada en la formación de un complejo rojo cuando el indol reacciona con el grupo aldehído del dimetilamino benzaldehído.

3.5.4.2 PRUEBA DE HEMOLISIS

Detecta la presencia de hemolisina, enzima que permite la clasificación de los ***Streptococcus*** en alfa (hemólisis parcial, incompleta que torna color verdoso), beta (hemólisis total) y gamma hemolíticos (no existe hemólisis). Muchas otras bacterias, aparte de los ***Streptococcus***, como por ejemplo ***Listeria***, pueden tener esta enzima. Se usa el cultivo para demostrar el grado de hemólisis (hemólisis beta) en la cual se puede observar claramente por detrás de la siembra.

3.5.4.3 PRUEBA CAMP

La prueba Christie–Atkins–Munch–Peterson (CAMP) es una herramienta muy útil que facilita la identificación de las especies de ***Listeria spp*** a partir de los aislamientos.

Consiste en sembrar en estría una cepa β -hemolítica de ***Staphylococcus aureus*** y de ***Rhodococcus equi*** formando unas únicas líneas rectas y paralelas, en una placa de agar sangre de oveja; las estrías deben tener la suficiente separación para permitir que las cepas de *Listeria* de prueba y de

control se puedan sembrar perpendicularmente, entre los dos organismos indicadores, sin que los toquen.

La prueba positiva se evidencia por la presencia de una zona de potenciación de la hemólisis en forma de puntas de flecha en el lugar donde se contactan las dos estrías.

La prueba CAMP aprovecha la capacidad hemolítica de las distintas especies de *Listeria* para su confirmación.

Listeria producen un factor llamado CAMP (factor de monofosfato de adenina cíclica) que aumenta la zona de hemólisis producida por un estafilococo productor de β -lisina.⁽³³⁾

3.5.5 LISTERIOSIS

La Listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. La enfermedad producida por ***Listeria monocytogenes*** afecta principalmente a segmentos específicos de la población cuya vulnerabilidad es mayor por ejemplo a personas inmunodeprimidas, personas con una enfermedad o circunstancia subyacente grave, mujeres embarazadas, fetos, recién nacidos y a personas mayores.

Una característica importante de la Listeriosis transmitida por alimentos es que el patógeno puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración hasta alcanzar cifras significativas, si transcurre suficiente tiempo. A pesar de que son muchos y diversos los alimentos que pueden contaminarse con ***L. monocytogenes***, las epidemias y los casos esporádicos de Listeriosis están predominantemente asociados a alimentos listos para el consumo, verduras, hortalizas, carnes frescas o procesadas, mariscos, quesos, leches. ⁽²⁵⁾

3.5.6 CUADRO CLÍNICO DE LISTERIOSIS

Listeriosis presenta dos tipos de cuadro:

- Invasivo
- Gastroentérico

El cuadro más severo, presenta severas manifestaciones invasivas siendo estas: septicemia, meningitis, conjuntivitis, encefalitis, endocarditis, partos prematuros, abortos, nacidos muertos. La enfermedad tiene un 20 % de letalidad. El período de incubación es de 7 a 30 días y el 85 a 90 % requiere hospitalización.

Por otro lado, el cuadro gastroentérico puede presentar desde portadores sin síntomas hasta individuos con signos gastrointestinales como: Diarrea, náuseas, calambres abdominales.⁽²³⁾

También pueden presentarse síntomas menos graves como dolor de cabeza, gripe, fiebre, dolor muscular, cansancio, tensión en el cuello. ⁽³⁸⁾

3.5.7 LISTERIOSIS DURANTE EL EMBARAZO

Las mujeres embarazadas son especialmente propensas a sufrir bacteremia por ***L. monocytogenes***, suele producirse en el tercer trimestre del embarazo y cursar como un cuadro pseudogripal de evolución favorable. Es muy poco frecuente el desenlace fatal en la madre, pero si no se proporciona el tratamiento adecuado se suele producir una infección fetal debido a que ***Listeria monocytogenes*** tiene la capacidad de atravesar la barrera placentaria. La afectación fetal puede ser causa de aborto, alumbramiento de un niño muerto o parto prematuro del neonato.

Los lactantes infectados por vía transplacentaria experimentan Listeriosis de inicio temprano cuyo cuadro clínico es denominado granulomatosis infantiséptica que se caracteriza por la formación de abscesos o granulomas diseminados en órganos internos como hígado, pulmón, bazo, riñón y cerebro. Por otra parte los lactantes infectados por contacto con líquidos corporales contaminados durante el parto presentan Listeriosis de inicio tardío caracterizada por meningitis. (26, 32,2)

No hay ninguna prueba rutinaria para medir la susceptibilidad de la Listeriosis durante el embarazo, como los hay para la rubéola y otras infecciones congénitas. Se presenta como una enfermedad transitoria con síntomas inespecíficos, leves a moderados, que incluyen: fiebre, cefalea, vómitos, molestias gastrointestinales y dolor lumbar. Suelen aparecer días o semanas después de ingerido el alimento, lo que impide determinar la dosis infectiva.(18)

3.5.8 TRATAMIENTO

- En la mujer embarazada:

Se recomienda como tratamiento de elección alta dosis de Penicilina o de Ampicilina, pero la respuesta suele ser pobre debido a la poca penetración celular. Trimetoprima-Sulfametoxazol parece que es más efectivo, debido a las altas concentraciones celulares. Pero éste está contraindicado en el primer trimestre del embarazo: Trimetoprima es teratogénico. En el último trimestre tampoco debe usarse, ya que el Sulfametoxazol desplaza a la bilirrubina de la albúmina (kernicterus neonatal) por lo también está contraindicado en la lactancia.

Otra terapia alternativa sería la Gentamicina.

El tratamiento debe ser siempre combinado:

Penicilina G 240.000 á 320.000 U/kg/día, cada 4 horas + Tobramicina 5 á 6 mg/kg/día cada 8 horas

Un plan alternativo, pero con menos ventajas, es usar Ampicilina + Gentamicina en dosis similares.^(13,32)

- En individuos de edad avanzada, personas inmunocomprometidas y lactantes

El tratamiento de elección para Listeriosis en estos individuos es la Penicilina o Ampicilina solas o asociadas a Gentamicina. La Eritromicina es una alternativa en personas alérgicas a la penicilina y sus derivados.

Cabe señalar que algunas publicaciones subrayan la ineficacia de la Penicilina, pero los reportes sólo están basados en fracasos terapéuticos; de hecho, los fármacos más utilizados para tratar la Listeriosis son ésta y la Ampicilina: la combinación Penicilina–Gentamicina logra efectos sinérgicos contra el microorganismo, tanto in vitro como in vivo, por lo cual representa el tratamiento estándar de la Listeriosis humana. ⁽³¹⁾

Otra alternativa consiste en usar Trimetropin-Sulfametoxazol. La Listeriosis sin tratamiento en estos grupos de pacientes casi siempre es mortal. Inclusive con la terapéutica adecuada produce la muerte en 13 a 34% de los adultos con Listeriosis sistémica aguda, en 15 a 50% de los lactantes con Listeriosis de inicio temprano y en 10 a 20% de los lactantes con Listeriosis de inicio tardío.

La infección de los adultos inmunocompetentes suele ser leve y autolimitante por lo tanto no requiere tratamiento.⁽³⁴⁾

3.5.9 EPIDEMIOLOGIA

La Listeriosis puede presentarse esporádicamente o en epidemias; en ambas situaciones, los alimentos tanto de origen animal (cárnicos y lácteos) como de origen vegetal (verduras, frutas y hortalizas) contaminados son los principales vehículos de transmisión de *L. monocytogenes*.

A pesar que Listeriosis suele presentarse con una baja frecuencia, se ha ido convirtiendo en una de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos más letales conocidas, causando gran alarma a nivel mundial a productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias.

Durante muchos años, el aislamiento de *Listeria* fue muy infrecuente, y la epidemiología de la enfermedad una auténtica incógnita. Sin embargo, a partir finales de los años setenta, el número de aislamientos comenzó a incrementarse, y a partir de los años ochenta la presentación de brotes epidémicos humanos en Europa, Estados Unidos y Canadá permitió asociarlos por primera vez directamente con el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*. Su revelación obedece al uso extensivo de la refrigeración por el hombre. No es difícil comprender que la conservación y la industrialización de los alimentos trajeron como consecuencia algunos cambios que dieron lugar a brotes masivos por *Listeria* en lugar de casos esporádicos.

Los alimentos implicados con mayor frecuencia en los brotes de Listeriosis en el hombre son los productos elaborados que no necesitan cocción antes de su consumo. (22,13)

Desde entonces han continuado reportándose brotes de Listeriosis humana de forma más frecuente:

En Suiza, desde 1983 a 1987 hubo un total de 122 casos por contaminación de quesos: 65 casos se dieron en recién nacidos y mujeres embarazadas; y 57 casos en varones y en mujeres no embarazadas. Todos los pacientes eran mayores de 18 años de edad, siendo la tasa de mortalidad de 32% en la que la edad fue la única variable significativa asociada con el riesgo de morir.

En Canadá se dio un brote asociado al consumo de ensalada de col, afectando a 7 adultos y 34 niños recién nacidos y mujeres embarazadas, entre el 1° de marzo y el 1° de septiembre de 1981.⁽¹⁹⁾

En Finlandia (1998- 1999), la ingesta de manteca contaminada se tradujo en 25 enfermos con 6 decesos; 20 padecieron de sepsis, 4 de meningoencefalitis y 1 de abscesos en el hígado.⁽¹¹⁾

En Estados Unidos en 1998 y 1999 ocurrió un brote epidémico en el que se presentaron más de 100 casos y 21 muertos en 22 estados ligado al consumo de embutidos contaminados con *L. monocytogenes*. Otro brote de Listeriosis fue reportado entre noviembre del 2000 y Enero de 2001 en Carolina del Norte asociado al consumo de queso casero estilo mexicano elaborado con leche sin pasteurizar, proveniente de una lechería local. Y en 2011 un brote de Listeriosis debido a melones contaminados deja 28 fallecidos y 116 personas enfermas.⁽²⁵⁾

Actualmente las cifras de incidencia anual de Listeriosis notificadas oscilan entre: 0,1 a 11,3 casos por millón de personas 0,3 a 7,5 casos por millón de personas en Europa, 4,4 casos por millón de personas en los Estados Unidos de América y 3 casos por millón de personas en Australia; sin embargo, la exactitud de estos valores es función del empeño que pone cada país en la ejecución de los programas nacionales de vigilancia de la Listeriosis. Dada la gravedad de la Listeriosis, los afectados con frecuencia solicitan atención

médica. Según cálculos de los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América, el 90% de los enfermos de Listeriosis es hospitalizado y aproximadamente la mitad de los casos se notifica a los CDC, frente a la tasa de identificación del 3% de la mayoría de los demás patógenos transmitidos por alimentos. La Listeriosis se observa principalmente en países industrializados, pero no se sabe si las diferencias entre las incidencias en los países desarrollados y en los países menos desarrollados se deben a diferencias geográficas verdaderas, a las diferentes costumbres alimentarias y medios de conservación de los alimentos, o a diferencias en las prácticas de diagnóstico y notificación. (25)

3.6 DEFINICION DE GERMICIDAS

Es una sustancia que destruye 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. (8)

3.7 GENERALIDADES DE LOS GERMICIDAS

Los agentes germicidas se han desarrollado en una gran medida y hoy en día existen diversos métodos físicos y químicos para eliminar los microorganismos de los objetos inanimados y los seres vivos.

Los tratamientos con agentes germicidas generalmente se realizan en solución acuosa por inmersión o aspersion. El alcance del tratamiento depende del compuesto desinfectante y de los microorganismos que se quieren eliminación.

(32)

3.7.1 CARACTERÍSTICAS DE UN GERMICIDA IDEAL

- Debe ser soluble en agua.
- Amplio espectro de actividad.
- Estable: tiempo prolongado de vida útil.
- No debe reaccionar con materia orgánica ni inactivarse en presencia de ella.
- Escasa o nula toxicidad para el ser humano.
- Acción rápida.
- Capacidad de penetración.
- Acción residual.
- Compatible con todos los materiales.
- Disponibilidad y buena relación costo-riesgo-beneficio.
- No debe afectar al medio ambiente ⁽³⁴⁾

3.7.2 CLASIFICACION DE GERMICIDAS

Los germicidas se pueden clasificar en 3 clases:

-Destructores de la membrana celular: Son germicidas como el hipoclorito de sodio o ácido peracético, que son agentes altamente oxidantes y pueden causar la destrucción total de la membrana celular. Esto significa la muerte real microbiana.

-Inhibición de la alimentación bacteriana y de la eliminación de desechos: Algunos germicidas como los compuestos de amonios cuaternarios, tienen la capacidad de adherirse a específicos lugares de la membrana celular de las

bacterias. Esto se debe a que los amonios cuaternarios poseen una carga positiva en solución y se adhieren a ciertas partes de la membrana celular con carga negativa. De esta manera evitan que la bacteria tome nutrientes y previene la eliminación de desechos que se acumulan dentro de su estructura. En efecto la célula muere por falta de nutrientes y por contaminación por los desechos acumulados en su interior.

-Inactivación de enzimas críticas: Biocidas, como compuestos fenólicos, entran en la célula bacteriana y reaccionan químicamente con ciertas enzimas vitales que sustentan tanto el crecimiento como actividades metabólicas que le proveen energía a la bacteria para poder reproducirse. Si este mecanismo no se realiza en forma completa la bacteria puede regenerarse nuevamente luego de varias horas y recontaminar la superficie. ⁽¹⁰⁾

3.7.3 HIPOCLORITO DE SODIO

El cloro es el desinfectante más utilizado en la industria alimentaria debido a su efectividad y bajo costo. Su mecanismo de acción se basa en una reacción de oxidación. Es altamente reactivo en presencia de materia orgánica, reaccionando con muchos grupos funcionales oxidándolos. Su capacidad de destruir microorganismos depende de la cantidad de cloro residual libre, es decir el ácido hipocloroso restante después de reaccionar con la materia orgánica presente en el agua.

El efecto de soluciones de hipoclorito sobre microorganismos en la superficie de frutas y hortalizas está bien documentado. En general se utiliza en concentraciones entre 50 y 200 ppm durante 1 o 2 minutos ⁽³¹⁾ Posee un alto poder germicida contra bacteria gran positivas y gran negativas.

3.7.4 ACIDO LACTICO

Es un líquido viscoso, claro, levemente amarillento y completamente soluble en agua.

Al ser un compuesto de naturaleza ácida, su acción germicida es atribuible a que afectan el pH del medio, desnaturalizan las proteínas y afectan el funcionamiento de la membrana celular. (18)

Se ha comprobado su eficacia germicida en concentraciones del 1%-2%. (30)

3.7.5 ACIDO ACETICO

Los sanitizantes ácidos tienen un amplio espectro germicida y tienen una relación costo beneficio muy buena. Son generalmente resistentes a los residuos orgánicos. Debido a su bajo pH eliminan restos de las sales inorgánicas presentes en aguas duras y depósitos como la piedra de leche. (38)

Este compuesto tiene acción bactericida a concentración el 5%, bacteriostático a concentraciones inferiores.

Dentro de los beneficios de este activo es que es un compuesto que normalmente es aprobado sin riesgo como ingrediente de alimentos.

Su uso se basa en lograr un pH bajo que impida la proliferación de microorganismos no deseados. Sin embargo también tiene acción antimicrobiana por sí mismo. En este sentido es activo a pH ácido en su forma no ionizada. En esta forma el ácido pasa a través de la membrana celular llegando al citoplasma. Debido a que el pH intracelular es cercano a la neutralidad, el ácido se disocia dentro de la célula, acidificando el interior celular causando efectos inhibidores de reacciones enzimáticas y sistemas de transporte. (32)

3.7.6 YODO

El yodo es uno de los mejores antisépticos conocidos. Mas sin embargo no se recomienda su uso en alimentos.

En microbiología se utiliza ampliamente como solución de referencia para la aplicación del Método Kirby Bauer Modificado, por ser una sustancia de amplio espectro contra los microorganismos.

Tiene actividad contra bacterias, hongos, esporas, levaduras, protozoos y virus. Si bien se encuentra disponible en altas concentraciones en diversos complejos (con ion yoduro, poloxámero, povidona, etc.), denominados yodóforos o tinturas, su solubilidad es sólo de 0.033% (1:3.000), la ventaja de los yodóforos o concentrados de yodo es que poseen un reservorio (denominado yodo disponible), los cuales permiten reponer el yodo perdido por la combinación con componentes microbianos y materiales orgánicos, y mantener una acción sostenida.

Una solución de yodo al 1% destruye la mayoría de las bacterias en el curso de 10 segundos, una solución de 1:20.000 (al 0.05%) destruye la mayoría de los microorganismos en 1 minuto y una solución de 1:500.000 (al 0.0002%) de yodo destruye a la mayoría de las bacterias presentes en el curso de 10 minutos. Una solución al 0.15% puede destruir esporas bacteriana húmedas, quistes amebianos y virus entéricos alrededor de 15 minutos, pero, para la destrucción de las esporas bacterianas secas puede tardar horas, aun cuando se utilice una solución de 1:3.000.

Una tintura de yodo al 1% aplicada en la piel destruirá un 90% de las bacterias en un tiempo de 90 segundos.

La solución al 2% es la mejor preparación de venta libre dado que carece de efectos irritantes.

El yodo puede utilizarse para purificar el agua potable, aunque Giardia es menos sensible que las bacterias y las amebas, y su destrucción requiere mayor concentración de yodo y más tiempo de exposición. (28)

3.8 RESISTENCIA MICROBIANA

La resistencia a múltiples sustancias es un problema de salud pública que se viene observando a nivel mundial después de la aparición de los antibióticos.

El uso indiscriminado de los antibióticos y la presión selectiva ambiental realizada por antisépticos, desinfectantes y germicidas ha generado una respuesta de supervivencia en los microorganismos, que los capacita para evadir con eficiencia la acción bactericida de algunos agentes. En la actualidad se intenta dilucidar si hay mecanismos compartidos entre antibióticos, antisépticos y desinfectantes que les permita a las bacterias y otros microorganismos activar genes que potencialmente expresen los mecanismos propuestos hasta ahora como respuesta evolutiva a la intervención humana.

Se ha obtenido un avance considerable en la comprensión de la respuesta de las bacterias a los bactericidas. La resistencia puede ser una propiedad natural de un organismo (intrínseca) o conseguida por mutación o adquisición de plásmidos (autorreplicación, ADN extracromosómico) o transposones (cromosomal o integrado en plásmidos, cassettes de ADN transmisibles). Los genes de resistencia naturales en plásmidos, se originan como mutaciones puntuales en los genes blanco (sitios de inserción de los genes de resistencia) de bacterias susceptibles y también de genes que les proveen protección contra otras bacterias. (39)

El manejo o aplicación de los germicidas, no siempre cuenta con una capacitación o la información adecuada para el usuario por que se busca solamente demostrar la eficacia del producto a costa de su seguridad, que es lo que debe garantizar. Por esta razón el uso eleva, a criterio propio, la concentración del desinfectante, aumenta la frecuencia de su aplicación o prolonga la longitud del tratamiento. En otras ocasiones hace lo contrario y, generalmente por razones de orden económico disminuye la concentración del producto, afecta la correcta periodicidad de los tratamientos o simplemente cambia de desinfectante, sin evaluar lo que usa, comparativamente con el desinfectante que pretende introducir.

Vista así la situación, es de imaginar las consecuencias negativas que emergen por esta conducta ya que sin saberlo, o con pocos conocimientos de causa, se establece un cuadro de resistencia microbiana adquirida. (29)

3.9 KIRBY BAUER MODIFICADO

El método de difusión en disco, descrito originalmente en 1966, ha sido bien estandarizado y se ha evaluado ampliamente. Organismos oficiales han recomendado, con modificaciones menores, como un método de referencia que podría ser utilizado como una técnica de rutina en el laboratorio, es la prueba más utilizada para determinar susceptibilidad a los antibióticos (15)

Este método se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano medido bajo condiciones estándar. Para lo cual se miden los halos de inhibición producidos por un desinfectante o un antiséptico preparado a una concentración determinada, al difundirse sobre la superficie del medio solido cubierta con el microorganismo de prueba.

El método Kirby Bauer Modificado es un método para evaluar la efectividad de los desinfectantes al determinar la eficacia de este por medio de la inhibición del crecimiento bacteriano.

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 debido a su amplio espectro contra microorganismos.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio es **transversal** ya que esta investigación se realizó en un tiempo determinado, estudiando lo que es de interés en el presente es decir en el momento que se va a realizar la investigación. **Campo** ya que se estudió el fenómeno en el escenario natural donde se manifiesta. Se considera también un estudio **experimental** debido a que se clasifica como un estudio de laboratorio ya que las muestras que se recolectaron se transportaron a un laboratorio para su análisis de carácter microbiológico.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA

Se realizó a través de visitas y consultas a las siguientes instituciones:

- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia “Benjamín Oroscó” de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca “P. Florentino Idoate, S J” de la Universidad Centroamericana José Simeón Cañas UCA.
- Biblioteca de la Universidad Alberto Masferrer (USAM)

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

Ubicación de mercado de mayoreo La Tiendona (Ver anexo N° 1)

Guía de observación: nos ayudó a describir las condiciones higiénicas actuales en la comercialización de espinaca en los puestos de venta del Mercado de Mayoreo La Tiendona. (Ver anexo N° 2)

Universo: 30 puestos de venta de espinaca, que se encuentran en el Mercado La Tiendona.

Muestra: espinaca obtenida de los puestos seleccionados.

Tamaño de muestra:

Para determinar el tamaño total de muestra se realizó una prueba piloto.

La selección del número de muestras en una prueba piloto es criterio del analista pero debe de tomar en cuenta la naturaleza del estudio, y la muestra seleccionada debe ser una pequeña porción del universo.

En esta investigación se muestrearon 15 puestos que corresponden al 50% del universo de los cuales se tomó una muestra por cada puesto. Totalizando así 15 muestras para la realización de ésta prueba ya que se considera que este número es representativo en comparación con el universo de este estudio. (20,4)

Esta prueba se realizó con el fin de determinar los valores experimentales de p y q los cuales se introdujeron en la siguiente fórmula (20, 4):

$$n = \frac{pqZ^2}{d^2}$$

Donde:

n= Número total de muestras

p= probabilidad de éxito

q= probabilidad de fracaso

d²= margen de error de 4% (valor estándar de 0,04)

Z²= nivel de fiabilidad de 95% (valor estándar de 1,96)

Los valores obtenidos en la prueba piloto de la probabilidad de éxito (p) y de la probabilidad de fracaso (q) fueron los siguientes:

$$p: 0.99$$

$$q: 0.01$$

Sustituyendo en la fórmula.

$$n = \frac{(0.01)(0.99)(1.96)^2}{(0.04)^2}$$

$$n = 24$$

El resultado obtenido en la operación matemática indicó el tamaño de muestra definitivo.

Con una probabilidad de éxito de 99% y con una probabilidad de fracaso de 1% el número total de muestras analizadas fue: 24 muestras

Toma de muestras:

Para la recolección de las muestras se llevó a cabo el muestreo aleatorio simple, con el propósito que todas las muestras tuvieran la misma probabilidad de ser seleccionadas.

El muestreo para la prueba piloto se realizó en 2 semanas. En la semana 1 se tomaron 7 muestras y en la semana 2 se tomaron 8 muestras de espinaca. Y en la tercera semana se tomaron las 9 muestras restantes para completar el número total de muestras de 24.

Las muestras fueron transportadas al laboratorio asépticamente en bolsas plásticas estériles.

4.4 PARTE EXPERIMENTAL

4.4.1 ENRIQUECIMIENTO DE LA MUESTRA

1. Tomar 25 g de la muestra en forma aséptica.
2. Agregar 225 mL de Caldo de Enriquecimiento de *Listeria* (LEB), colocar en el Stomacher por 3 minutos a 260 rpm.
3. Incubar a 35° C por 24-48 horas. (5)

4.4.2 AISLAMIENTO DE *Listeria*

1. Tomar una asada del medio de cultivo de enriquecimiento (LEB) y estriar en medio de cultivo Oxford (OXA) y Palcam por duplicado.
2. Incubar las placas de agar Oxford y Palcam por 24-48 horas a 35° C, luego refrigerar a 4° C por 24 - 48 horas más para su óptimo crecimiento y caracterización de colonias.
3. Verificar características de colonias

Oxford: colonias negras con halo negro

Palcam: colonias negras con halo negro
4. Transferir 5 colonias típicas del agar Palcam por duplicado a placas de agar tripticosa soya + 2.0% de extracto de levadura (TSAye).
5. Incubar placas a 35° C por 24 horas
6. Verificar características de las colonias. (5)

TSAye: Colonias de color beige, con la luz presentan una coloración azul.

4.4.3 IDENTIFICACION DE *Listeria monocytogenes*

Las pruebas de identificación que se realizaron son las siguientes (tanto a las muestras como a la cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 18952 control):

4.4.3.1 CATALASA.

1. Seleccionar una colonia típica de una placa de TSAye con asa en punta y colocar sobre un porta objeto.
2. Agregar una gota de peróxido de Hidrogeno al 3 % (H₂O₂). Un burbujeo en los primeros segundos indica reacción positiva.



4.4.3.2 HEMOLISIS.

1. Dibujar de 20-25 espacios en la base de la placa que contiene agar sangre de carnero al 5%.
2. Inocular con asa en punta colonias típicas de las placas de TSAye a placas de agar sangre de carnero al 5%, punzar una colonia por espacio dibujado en la placa.
3. Incubar a 35°C por 24 – 48 horas
4. Observar la formación de un halo claro alrededor de la colonia color beige ⁽⁵⁾

4.4.3.3 MOVILIDAD

1. De las placas de TSAye con un asa en punta tomar una colonia e inocular en un tubo que contenga medio motilidad.

2. Incubar por siete días a temperatura ambiente.

3. Observar formación de sombrilla.

4.4.3.4 TSI

1. De las placas de TSAye con una asa en punta tomar una colonia típica e inocular en el tubo que contiene medio TSI.

2. Incubar de 24-48 horas a 35° C. ⁽³⁾

4.4.3.5 REACCIÓN DE VOGES-PROSKAUER

1. Realizar una suspensión del microorganismo en estudio utilizando un asa circular y un tubo que contiene 0.5 ml del medio Voges-Proskauer.

2. Incubar durante 24 horas a 35° C

3. Agregar 10 gotas de la solución de α - naftol.

4. Agregar 5 gotas de la solución de hidróxido de potasio; luego, agitar bien durante un minuto.

5. Una coloración rojiza (que puede aparecer con extrema lentitud) indica un resultado positivo. ⁽⁷⁾

4.4.3.6 REACCIÓN DE INDOL

1. Inocular un tubo que contiene 1 ml de medio de triptona – peptona con el microorganismo en estudio e incubar durante 24 horas a 35° C

2. Agregar diez gotas del reactivo de kovac a cada tubo

3. La aparición de una coloración roja indica una prueba positiva.

4.4.3.7 PRUEBA DEL ROJO DE METILO

1. Inocular un tubo que contenga medio de rojo de metilo con colonia de microorganismo en estudio e incubar durante 24 horas a 35° C.
2. Agregar 4 o 5 gotas del indicador al inóculo.
3. La aparición de una coloración roja denota un resultado positivo y una coloración amarilla demuestra un resultado negativo. (7)

4.4.3.8 PRUEBA DE CAMP

1. En placas que contienen agar sangre de oveja desfibrinada estriar un cultivo de ***Staphylococcus aureus***, β hemolítico y otro de ***Rhodococcus equi*** en paralelo y diametralmente opuesto el uno del otro en una placa de agar sangre de oveja. Luego estriar el inóculo de la muestra en forma paralela uno de otro pero en ángulo recto entre las estrías del ***Staphylococcus aureus*** y ***Rhodococcus equi***.
2. Incubar a 35° C por 24-48 horas.
3. Examinar placas observar formación de flecha. (5)

4.4.4 DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA POR EL MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO

4.4.4.1 MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO

1. Utilizar como microorganismo de prueba ***Listeria monocytogenes*** aislada de las diferentes muestras de espinaca.

2. Sembrar el microorganismo de prueba en tubos conteniendo medio inclinado de agar tripticasa soya e incubar a 37° C por 24 horas.
3. Preparar un tubo patrón de McFarland al 0.5% de la siguiente manera: Combinar 0.5 mL de solución de cloruro de bario al 1% y 99.5 mL de solución de ácido sulfúrico al 1%, formándose una turbidez de sulfato de bario equivalente a 10^3 bacterias por mL.
4. De los tubos de siembra en medio inclinado de agar tripticasa soya, tomar con asa bacteriológica estéril de 2 a 3 colonias y pasar a otro tubo de ensayo conteniendo 10 mL de caldo tripticasa soya, incubar a 37° C por 2 a 8 horas. Comparar la turbidez desarrollada con el tubo patrón de McFarland al 0.5%.
5. Introducir un hisopo estéril en el caldo que contiene la suspensión de microorganismos con crecimiento microbiano equivalente a 10^3 Unidades Formadoras de Colonias por mL y rotar en las paredes del tubo para eliminar el exceso de inóculo.
6. En 12 placas de petri inocular el microorganismo de prueba en la superficie del medio Mueller Hinton, extendiéndose uniformemente, inocular por duplicado.
7. Tapar las placas inoculadas y dejar secar de tres a cinco minutos; luego colocar por medio de pinzas estériles cuatro cilindros de acero inoxidable estériles a intervalos de 90° y un radio de 30 mm entre cada uno.
8. Agregar a los cilindros las soluciones de prueba y la solución patrón (yodo al 2%) de forma alterna, incubar a 37°C durante 24 horas.
9. Retirar los cilindros, tapar las placas de Petri e invertirlas para medir los halos de inhibición que produce la solución de prueba y control al difundirse sobre el medio, inhibiendo el crecimiento microbiano. (2)

10. Con un pie de rey medir los halos de inhibición producidos, y compararlos con los de la solución patrón.

Esquemas de metodología (Ver anexo N° 3)

4.4.4.2 PATRON DE COMPARACION (YODO) ⁽²⁸⁾

Se determinaron experimentalmente los halos de inhibición que produce la solución patrón (yodo 2%) frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 18952 los cuales servirán de referencia para determinar si las cepas aisladas de las muestras de espinaca son resistentes o sensibles frente a los germicidas de prueba.

Los halos producidos se muestran en la tabla N° 15 (Ver anexo N° 5)

NOTA: se utilizó como patrón de referencia una solución de yodo al 2%, ya que esta es una sustancia efectiva contra bacterias, hongos y protozoos; es decir por su amplio poder germicida.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 GUÍA DE OBSERVACIÓN.

Se realizó una lista de chequeo para el diagnóstico de las condiciones higiénicas en la comercialización de espinaca en los puestos de venta del mercado La Tiendona. (Ver anexo N°2)

Los resultados obtenidos se muestran a continuación.

Tabla N° 2 Puestos del mercado La Tiendona que cuentan con agua potable

| Si | No |
|----|------|
| 0 | 100% |

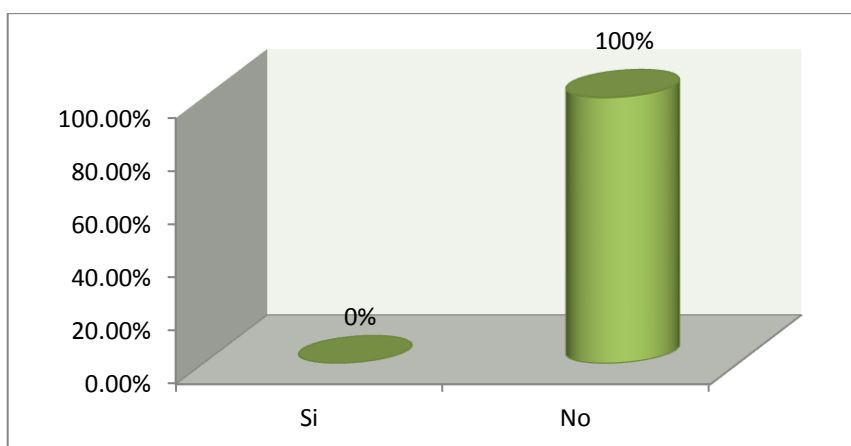


Figura N° 4 Grafico de los puestos del mercado La Tiendona que cuentan con agua potable.

La figura N° 4 nos indica que el 100% de los puestos donde se comercializa espinaca en el mercado no cuenta con un sistema de abastecimiento de agua potable. El espacio físico es muy reducido lo que limita que cada puesto cuente con su propio sistema de agua. Por lo que cada comerciante se abastece de la fuente de agua más cercana. Almacenándola en barriles y cantaros.

Tabla N° 3 Puestos del mercado La Tiendona que cuenta con sistema de drenaje

| Si | No |
|----|------|
| 0 | 100% |

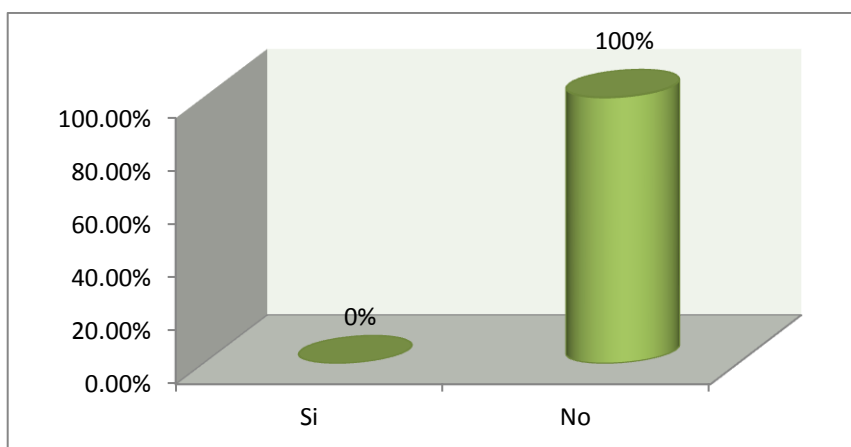


Figura N° 5 Grafico de los puestos del mercado La Tiendona que cuentan con sistema de drenaje.

En la figura N° 5 se muestra que el 100% de los puestos donde se comercializa espinaca en el mercado no cuenta con un sistema de drenaje. Por lo que la forma de eliminación de agua sucia es arrojarla a las cunetas adyacentes al puesto, que con la basura acumulada favorece a la proliferación de insectos y microorganismos creando un ambiente inadecuado para la comercialización de alimentos.

Tabla N° 4 Puestos del mercado La Tiendona que cuentan con depósitos de desecho

| Si | No |
|-----|-----|
| 76% | 24% |

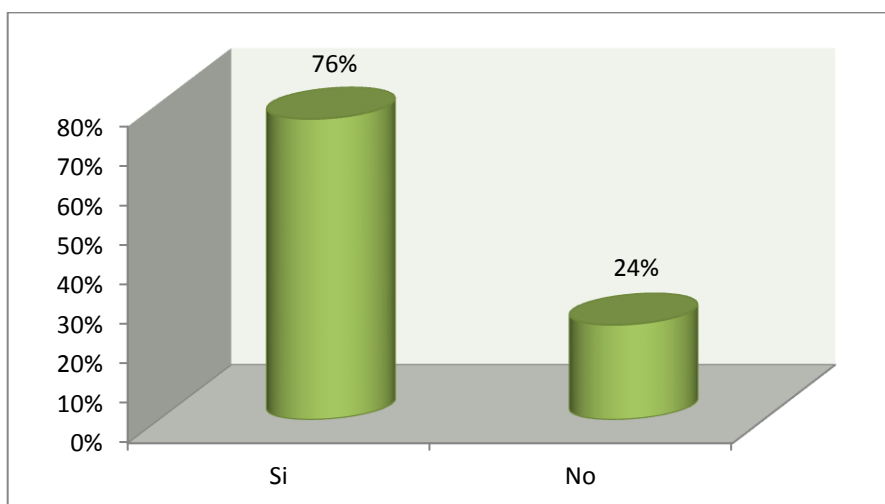


Figura N° 6 Gráfico de los puestos del mercado La Tiendona que cuentan con depósitos de desechos

La figura N° 6 muestra que el 76% de los puestos donde se comercializa espinaca en el mercado cuenta con un depósito de desecho, mientras el 24% de los puestos no poseen ningún depósito para los desechos. Cabe mencionar que los depósitos que poseen los puestos no son los adecuados ya que utilizan cubos partidos, cajas de cartón, bolsas plásticas de tamaño inadecuado por lo que los desechos se encuentran expuestos causando malos olores y como no se encuentran cubiertos proliferan insectos que pueden llegar a contaminar los alimentos (espinaca) que se comercializan.

De la misma manera ocurre un acumulo de basura ya que no hay personal encargado de recolectar la basura en el mercado, ocasionando más probabilidad de que la espinaca se contamine.

Tabla N° 5 Tipo de depósito en que se exhibe el alimento (espinaca) para su comercialización

| Mesa | Canasto | Suelo |
|------|---------|-------|
| 12% | 68% | 20% |

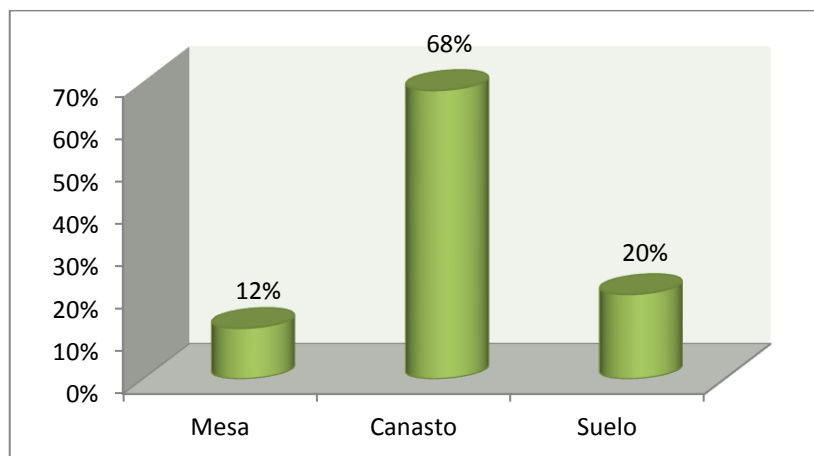


Figura N° 7 Gráfico de los tipos de depósito en que se exhibe el alimento (espinaca) para su comercialización

En la figura N° 7 se muestra que el 68% de los comerciantes exhibe el alimento (espinaca) en canasta para su comercialización, el 20% lo exhiben en el suelo mientras que el 12% lo exhibe en mesa. En el caso de los comerciantes que utilizan canastos se pudo apreciar que estos se encontraban deteriorados y sucios, lo que se señala que no los reemplazan ni higienizan periódicamente. Los puestos que exhiben sus productos en el suelo solo colocan un plástico para protegerlos del contacto con el suelo pero estos son los que se encuentran más propensos a contaminarse con agua sucia, insectos, heces entre otros. En cuanto a los que utilizan mesas para exhibir el alimento a pesar que son la menor proporción no están exentos que la espinaca no sufra contaminación ya que no existe separación ni clasificación con los demás productos que ahí se comercializan, al igual que las condiciones higiénicas de la superficie de la mesa no son las adecuadas ya que se encontraron podridas, deterioradas y sucias.

Tabla N° 6 Tipo de protección que se le da al producto para protegerlo de factores externos

| Cubierta con plástico | Cubierta con manta | Nada | Otros |
|-----------------------|--------------------|------|-------|
| 0% | 0% | 100% | 0% |

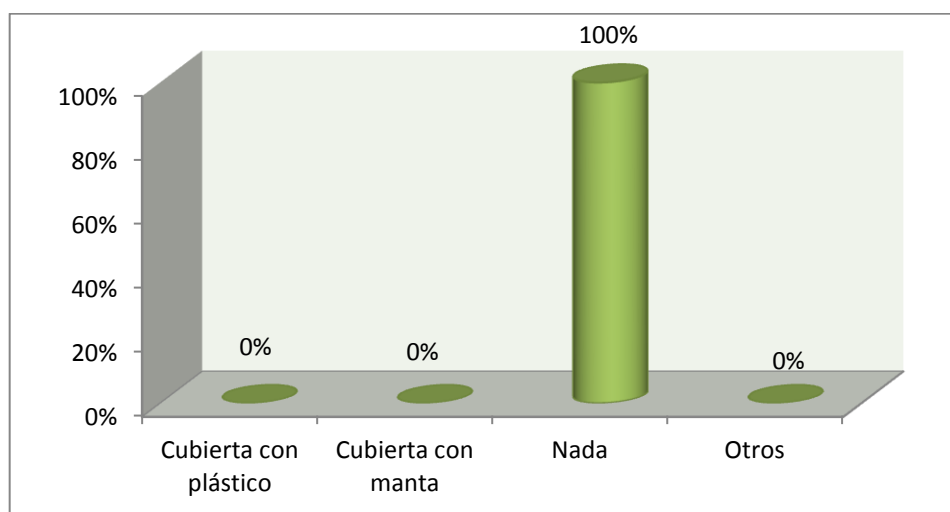


Figura N° 8 Gráfico de los tipos de protección que se le da al producto para protegerlo de factores externos.

En la figura N°8 se muestra que ninguno de los puestos donde se comercializa espinaca protegen al alimento durante su comercialización. La protección de los productos es un factor que generalmente no se toma en cuenta a la hora de su comercialización y es sin duda un aspecto crítico que evita la contaminación de los alimentos ya que crea una barrera que lo protege del ambiente y de insectos portadores de gérmenes.

Tabla N° 7 Tipo de almacenamiento que se le da al producto para mantenerlo fresco

| Cajas de cartón | Plástico | Cajilla | Ninguno |
|-----------------|----------|---------|---------|
| 8% | 28% | 56% | 8% |

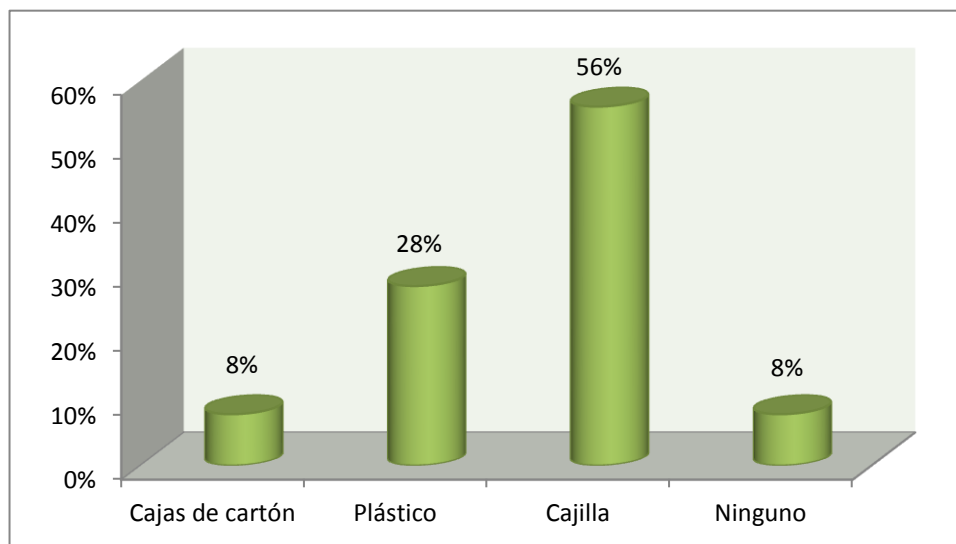


Figura N° 9 Gráfico del tipo de almacenamiento que se le da al producto para mantenerlo fresco

En la figura N° 9 se muestra que la mayoría de los comerciantes (56%) almacenan la espinaca en cajilla, mientras que el 28% solo la cubren con plástico, el 8% solo la almacena en cajas de cartón y en aquellos puestos donde el local es cerrado no utilizan ningún artículo para almacenarla.

El no dar tratamiento especial para el almacenamiento de este producto provoca que la carga microbiana aumente, convirtiendo la espinaca en vehículo para provocar enfermedades.

Tabla N° 8 Vestimenta del comerciante en los puesto de venta

| Delantal | Gabacha | Ninguno | Otros |
|----------|---------|---------|-------|
| 80% | 16% | 4% | 0% |

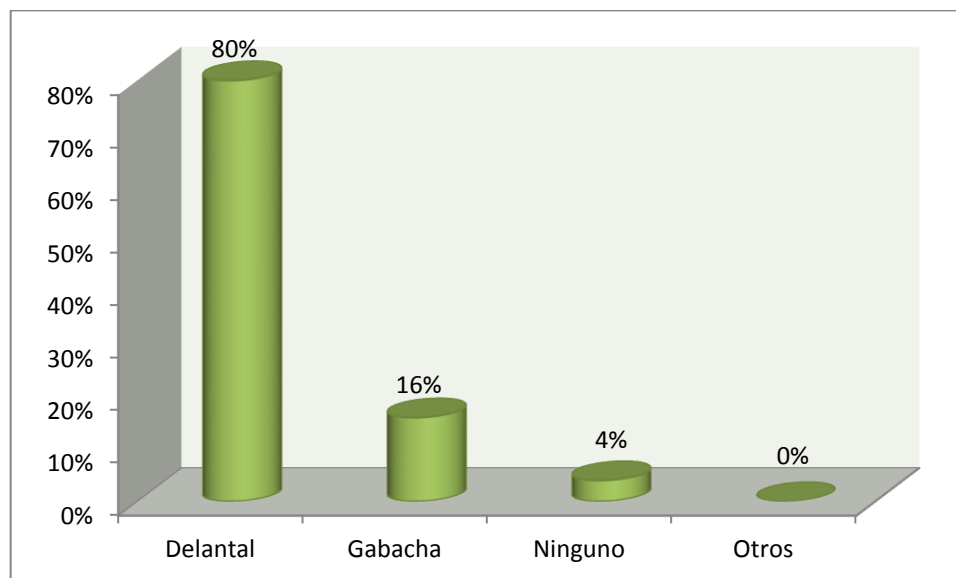


Figura N° 10 Gráfico del tipo de vestimenta del comerciante en los puestos de venta

En la figura N° 10 se muestra que el 80% de los comerciantes utilizan delantal como única indumentaria a la hora de comercializar la espinaca, el 16% utilizan gabacha y 4% no utiliza ninguna indumentaria durante la comercialización.

Tabla N° 9 Porcentaje de puestos en los que se observó si rocían con algún producto químico el alimento durante su comercialización

| Si | No |
|-----|-----|
| 16% | 84% |

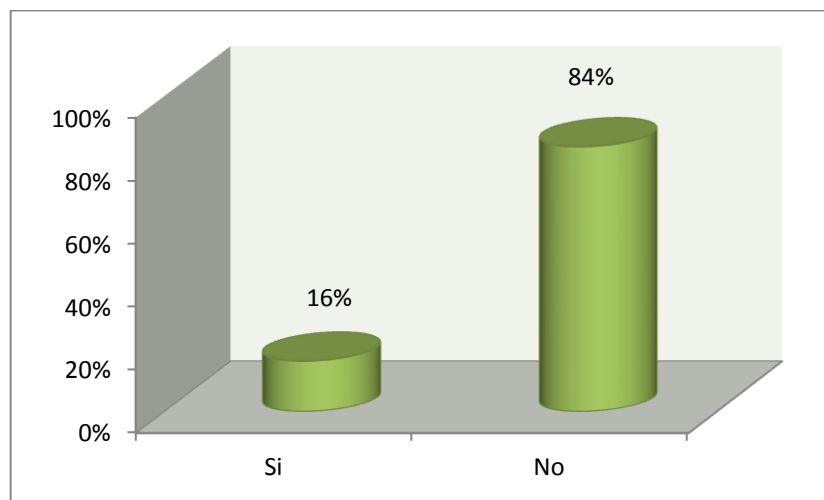


Figura N° 11 Gráfico de puestos en los que se observó si rocían con algún producto químico el alimento durante su comercialización

La figura N° 11 muestra que el 16% de los puestos que comercializan espinaca la rocían con lejía diluida durante la comercialización del alimento, mientras que no se observó en el 84% de los puestos que realicen tal práctica.

Según lo demuestra la guía de observación ninguno de los puestos de venta de espinaca seleccionados para el análisis cuenta con las condiciones higiénicas necesarias para la comercialización de este tipo de productos.

5.2 AISLAMIENTO

Se procesaron 24 muestras de espinaca. Al sembrar en los medios selectivos OXFORD y PALCAM se observó crecimiento en todas las placas correspondientes a todas las muestras (Ver anexo N° 10). Por lo que el 100% de las muestras analizadas contenían cepas de *Listeria spp.*

5.3 IDENTIFICACION DE *Listeria monocytogenes*

La simbología de los resultados de las pruebas realizadas utilizadas para la interpretación de los cuadros de resultados de la identificación de las cepas se observan en el anexo N° 6

De las 24 muestras analizadas 17 presentaron contaminación por *Listeria monocytogenes* las cuales corresponden a un 71% de cepas encontradas.

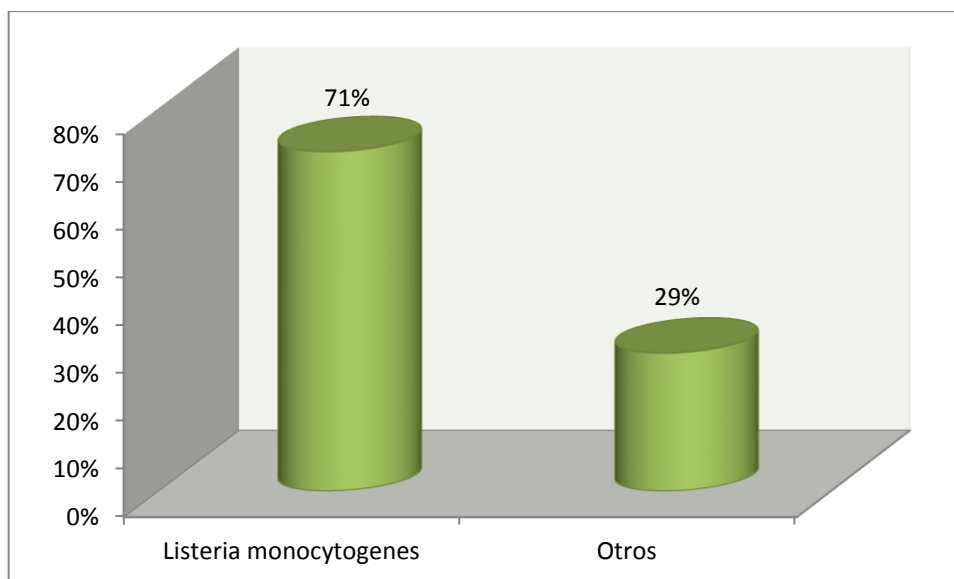


Figura N° 12 Gráfica del porcentaje de Identificación de cepas de *Listeria monocytogenes*

A continuación se presentan las tablas donde se refleja el resultado de las pruebas de identificación para el total de muestras (Ver anexo N° 11). Las pruebas de Identificación para cada muestreo se presentan en el anexo N°7

Tabla N° 10 Resultado de Pruebas Bioquímicas del total de muestras

| Muestras | Pruebas bioquímicas | | | | | |
|----------|---------------------|-----|-----|----|----|---|
| | Citrato | TSI | Mov | VP | RM | I |
| 1 | - | A/A | + | + | + | - |
| 2 | - | A/A | + | + | + | - |
| 3 | - | A/A | + | + | + | - |
| 4 | - | A/A | + | + | + | - |
| 5 | - | A/A | + | + | + | - |
| 6 | - | A/A | + | + | + | - |
| 7 | - | A/A | + | + | + | - |
| 8 | - | A/A | + | + | + | - |
| 9 | - | A/A | + | + | + | - |
| 10 | - | A/A | + | + | + | - |
| 11 | + | K/A | - | + | - | + |
| 12 | - | A/A | + | + | + | - |
| 13 | - | A/A | + | + | + | - |
| 14 | - | A/A | + | + | + | - |
| 15 | - | A/A | + | + | + | - |
| 16 | - | A/A | + | + | + | - |
| 17 | + | K/A | - | + | - | - |
| 18 | - | A/K | - | - | - | - |
| 19 | - | A/A | + | + | + | - |
| 20 | - | K/A | - | + | - | - |
| 21 | - | A/A | - | - | - | + |
| 22 | - | A/A | + | + | + | - |
| 23 | + | K/K | - | + | - | + |
| 24 | - | A/A | + | + | - | + |

+

Corresponde a *L. monocytogenes*

-

No corresponde a *L. monocytogenes*

Tabla N° 11 Resultado de otras pruebas de identificación del total de muestras

| Muestras | Catalasa | Hemólisis | CAMP | |
|----------|----------|-----------|------------------|----------------|
| | | | <i>S. aureus</i> | <i>R. equi</i> |
| 1 | + | + | + | |
| 2 | + | + | + | |
| 3 | + | + | + | |
| 4 | + | + | + | |
| 5 | + | + | + | |
| 6 | + | + | + | |
| 7 | + | + | + | |
| 8 | + | + | + | |
| 9 | + | + | + | |
| 10 | + | + | + | |
| 11 | - | + | | + |
| 12 | + | + | + | |
| 13 | + | + | + | |
| 14 | + | + | + | |
| 15 | + | + | + | |
| 16 | + | + | + | |
| 17 | + | + | | + |
| 18 | - | + | | + |
| 19 | + | + | + | |
| 20 | + | + | | + |
| 21 | + | + | | + |
| 22 | + | + | + | |
| 23 | + | + | | + |
| 24 | - | + | | + |

| |
|---|
| + |
|---|

Corresponde a *L. monocytogenes*

| |
|---|
| - |
|---|

No corresponde a *L. monocytogenes*

En las tablas N° 10 y N° 11 se presentan los resultados de las pruebas para la identificación de *Listeria monocytogenes*, mostrándose que las muestras de la 1 a la10, de la12 a la 16, las muestras 19 y 22 están conformes con las pruebas de identificación de *Listeria monocytogenes*.

Según el Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.04.50:08) (Ver anexo N° 4) *Listeria monocytogenes* debe estar ausente en la espinaca, por lo que el 71% de las muestras analizadas no cumplen con dicho reglamento.

La presencia de esta bacteria en las muestras analizadas puede deberse a la incorrecta manipulación por parte de los comerciantes, por no contar con métodos de almacenamiento adecuados, por la utilización de agua sucia para rociar la espinaca y simular su frescura y por la falta de higiene en el puesto de venta.

5.4 RESISTENCIA POR EL METODO KIRBY BAUER MODIFICADO

En las tablas de la 22 a la 39 (ver anexo N° 8), se presentan los resultados obtenidos en la prueba Kirby Bauer Modificado que se realizó para las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de las muestras de espinaca frente a los diferentes germicidas (Ver imágenes en anexo N° 12).

Tabla N° 12 Promedio de diámetros de halos de inhibición (mm) producidos por los germicidas de prueba y la solución patrón frente a las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas del total de muestras y de la cepa control ATCC 18952

| Muestra | Halos de Inhibición (mm) | | | | | | Yodo 2% |
|-------------------------------|--------------------------|-------|---------------|-------|---------------|-------|------------|
| | Hipoclorito de sodio | | Ácido Láctico | | Ácido Acético | | |
| | 1% | 2% | 1% | 2% | 4% | 5% | |
| 1 | 14.11 | 20.63 | 10.95 | 11.38 | 33.34 | 40.13 | 40.00 |
| 2 | 10.66 | 11.79 | 17.96 | 20.73 | 45.56 | 48.16 | 41.57 |
| 3 | 16.69 | 27.04 | 18.83 | 20.44 | 42.56 | 45.19 | 47.73 |
| 4 | 19.31 | 19.48 | 20.29 | 21.34 | 38.28 | 42.70 | 46.57 |
| 5 | 17.61 | 18.41 | 12.56 | 20.58 | 30.96 | 38.83 | 48.15 |
| 6 | 15.30 | 16.66 | 15.50 | 20.11 | 42.68 | 47.68 | 45.02 |
| 7 | 10.81 | 11.39 | 16.48 | 18.44 | 44.54 | 51.74 | 44.4 |
| 8 | 10.90 | 14.86 | 17.56 | 23.50 | 35.63 | 38.34 | 35.83 |
| 9 | 16.48 | 19.48 | 16.70 | 21.29 | 35.15 | 38.63 | 51.62 |
| 10 | 17.58 | 21.24 | 20.98 | 26.34 | 36.01 | 40.03 | 41.82 |
| 12 | 13.44 | 22.41 | 17.15 | 21.03 | 40.83 | 45.11 | 48.88 |
| 13 | 13.81 | 15.70 | 16.39 | 17.98 | 31.51 | 36.88 | 41.77 |
| 14 | 15.38 | 20.23 | 16.49 | 25.23 | 41.25 | 44.10 | 44.35 |
| 15 | 13.88 | 20.11 | 18.78 | 21.30 | 33.93 | 43.39 | 43.78 |
| 16 | 13.13 | 23.15 | 19.56 | 22.31 | 33.19 | 39.57 | 43.02 |
| 19 | 15.79 | 23.51 | 16.73 | 21.93 | 42.73 | 56.21 | 43.18 |
| 22 | 15.79 | 23.51 | 16.73 | 21.93 | 42.73 | 56.21 | 42.72 |
| Cepa control ATCC18952 | 16.12 | 17.36 | 17.14 | 20.49 | 36.21 | 42.57 | 34.00 |

En la tabla N° 12 se muestran los promedios de los halos obtenidos para cada uno de los germicidas a las diferentes concentraciones y solución patrón frente a las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de las muestras y la cepa control ATCC18952.

En las figuras de la 13 a la 18 se explican los resultados de las tablas de la 22 a la 39 (ver anexo N° 8), donde se presentan los resultados de los diámetros de los halos producidos por los germicidas Hipoclorito de sodio 1% y 2%, Ácido Láctico 1% y 2% y Ácido Acético 4% y 5% ante las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de las muestras.

El método Kirby Bauer Modificado determina si una muestra es resistente, sensible o de sensibilidad intermedia, las siguientes figuras describen el resultado obtenido según este criterio.

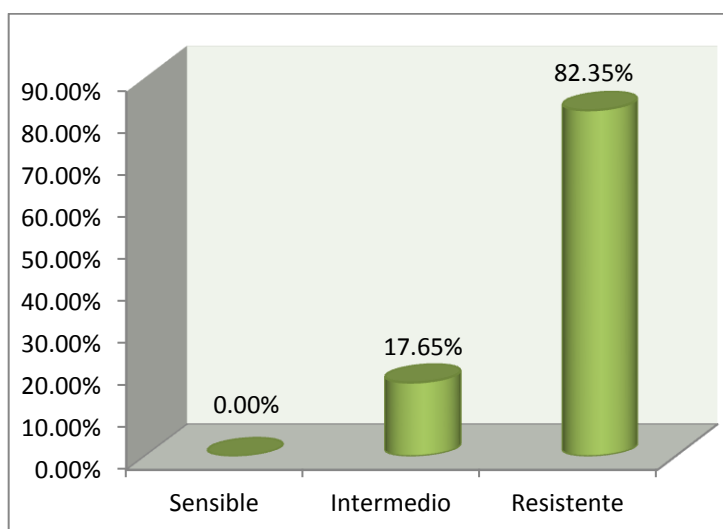


Figura N° 13 Gráfica de susceptibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* al Hipoclorito de sodio 1%

En la figura N° 13 se muestra el porcentaje de susceptibilidad de cepas de prueba de *Listeria monocytogenes* al Hipoclorito de sodio 1%, en la que se observa que el 82.35% de las cepas son resistentes a este germicida en concentración al 1% y el 17.65% de las cepas son de susceptibilidad intermedia, mientras ninguna cepa de prueba es sensible a este germicida.

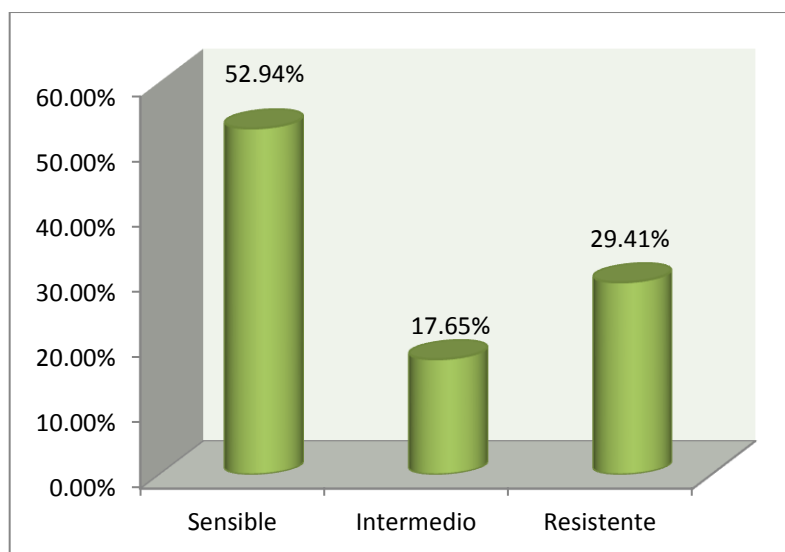


Figura N° 14 Gráfica de susceptibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* al Hipoclorito de sodio 2%

En la figura N° 14 se muestra el porcentaje de susceptibilidad de cepas de prueba de *Listeria monocytogenes* al Hipoclorito de sodio, en la que se observa que el 52.94% de las cepas son sensibles a este germicida en concentración al 2%, el 17.65% de las cepas son de susceptibilidad intermedia, mientras que el 29.41% de las cepas de prueba son resistentes.

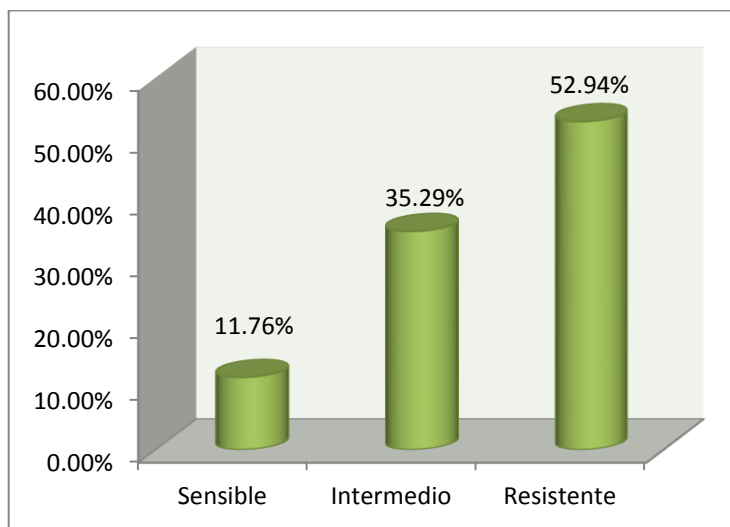


Figura N° 15 Gráfica de susceptibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* al Ácido Láctico 1%

En la figura N° 15 se muestra el porcentaje de susceptibilidad de cepas de prueba de *Listeria monocytogenes* al Ácido Láctico, en la que se observa que el 11.76% de las cepas son sensibles a este germicida en concentración al 1% el 35.29% de las cepas son de susceptibilidad intermedia, mientras que el 52.94% de las cepas de prueba son resistentes.

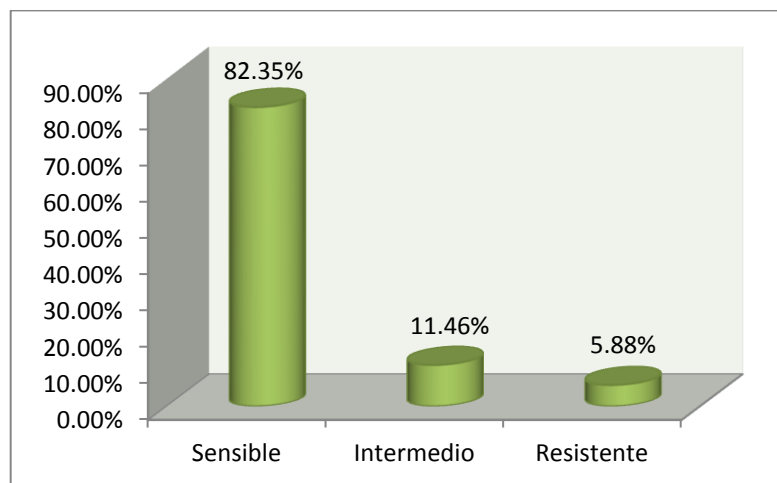


Figura N° 16 Gráfica de susceptibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* al Ácido Láctico 2%

En la figura N° 16 se muestra el porcentaje de susceptibilidad de cepas de prueba de *Listeria monocytogenes* al Ácido Láctico, en la que se observa que el 82.35% de las cepas son sensibles a este germicida en concentración al 2% y el 11.46% de las cepas son de susceptibilidad intermedia, mientras que el 5.88% de las cepas de prueba son resistentes.

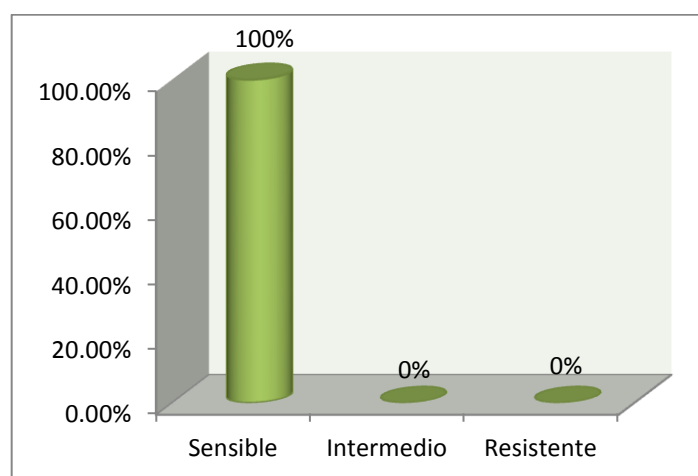


Figura N° 17 Gráfica de susceptibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* al Ácido Acético 4%

En la figura N° 17 se muestra el porcentaje de susceptibilidad de cepas de prueba de *Listeria monocytogenes* al Ácido acético, en la que se observa que el 100% de las cepas son sensibles a este germicida en concentración al 4%

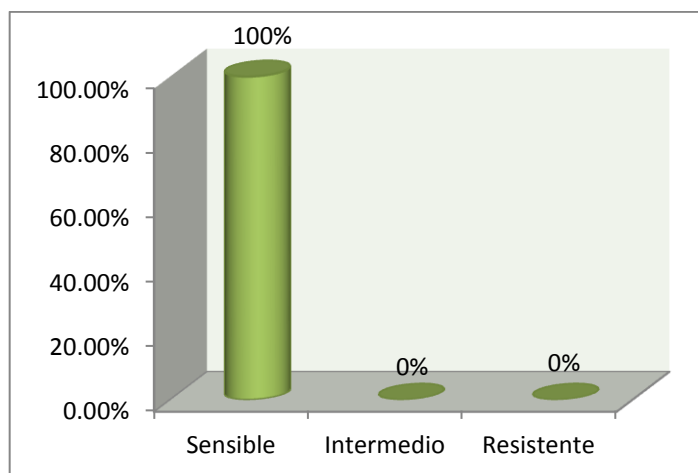


Figura N° 18 Gráfica de susceptibilidad de cepas de *Listeria monocytogenes* al Ácido Acético 5%

En la figura N° 18 se muestra el porcentaje de susceptibilidad de cepas de prueba de *Listeria monocytogenes* al Ácido acético, en la que se observa que el 100% de las cepas son sensibles a este germicida en concentración al 5%.

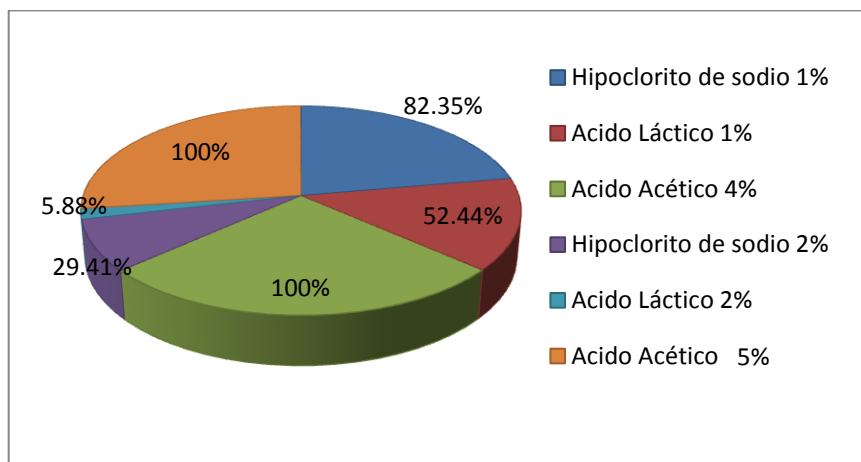


Figura N° 19 Gráfico de porcentaje de cepas de *Listeria monocytogenes* resistentes a los germicidas de prueba.

En la figura N° 19 se muestran los porcentajes de las cepas aisladas a partir de muestras de espinaca ante los germicidas de prueba, en la que el 82.35% de las cepas son resistentes al hipoclorito de sodio 1%, el 29.41% fue resistente al hipoclorito de sodio al 2%, el 52.44% fue resistente al Ácido Láctico 1%, el 5.88% fue resistente al Ácido Láctico al 2%, mientras que el 0% de las cepas fueron resistentes al Ácido Acético al 4% y 5%.

Tabla N° 13 Tabla de porcentaje de cepas de *Listeria monocytogenes* resistentes a múltiples germicidas

| Porcentaje | Nº germicidas | Germicidas |
|------------|---------------|--|
| 29.41% | 1 | Hipoclorito de sodio 1% |
| 52.94% | 2 | Hipoclorito de sodio 1%, ácido láctico 1% |
| 29.41 | 3 | Hipoclorito de sodio 1% y 2%, ácido láctico 1% |
| 5.88 | 4 | Hipoclorito de sodio 1% y 2%, ácido láctico 1% y 2% |
| 0 | 5 | Hipoclorito de sodio 1% y 2%, ácido láctico 1% y 2%, ácido acético 4% |
| 0 | 6 | Hipoclorito de sodio 1% y 2%, ácido láctico 1% y 2%, ácido acético 4% y 5% |

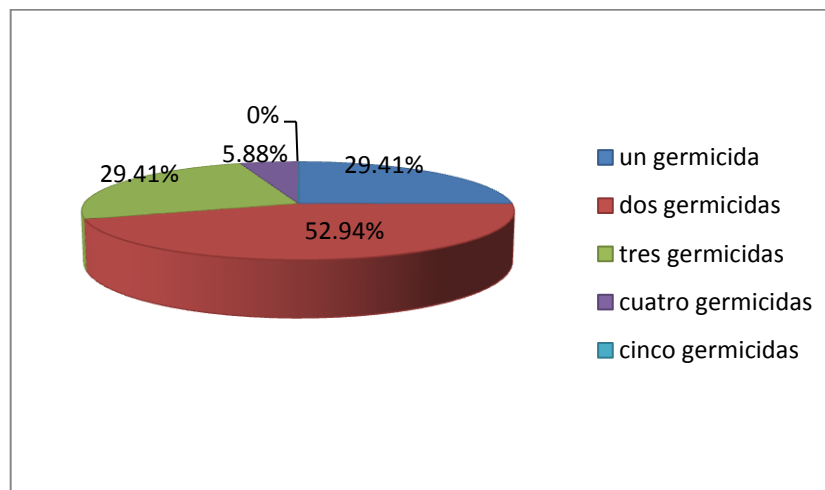


Figura N° 20 Gráfica de porcentaje de cepas de *Listeria monocytogenes* resistentes a múltiples germicidas

La figura N° 20 representa el porcentaje de cepas de *Listeria monocytogenes* resistentes a múltiples germicidas en donde ninguna de las cepas es resistente a todos los germicidas de prueba a sus diferentes concentraciones, el 5.88% es resistente a cuatro germicidas (Hipoclorito de sodio 1% y 2 % y Ácido Láctico 1 y 2%), el 29.41% es resistente a tres germicidas (Hipoclorito de sodio 1% y 2 % y Ácido Láctico 1%), el 52.94% es resistente a dos germicidas (Hipoclorito de sodio 1 y Acido Láctico 1%) y el 29.41% de las cepas es resistente únicamente a un germicida (Hipoclorito de sodio 1%)

De las cepas aisladas de *Listeria monocytogenes* ninguna presentó susceptibilidad a todos los germicidas de prueba en sus diferentes concentraciones.

El germicida al que las cepas presentaron mayor resistencia fue al hipoclorito de sodio 1%, solo para el Ácido Acético al 4% y 5 % el 100% de las cepas de prueba presentaron susceptibilidad, mientras que para los otros germicidas (Hipoclorito de sodio 1% y 2% y Acido Láctico 1% y 2%) las cepas también mostraron sensibilidad intermedia y resistencia.

Según los resultados obtenidos se observa que el 21.41% de cepas aisladas de *Listeria monocytogenes* han adquirido resistencia frente a los germicidas hipoclorito de sodio 1% y 2% y Ácido láctico 1%, mientras que frente a los germicidas Ácido acético 4% y 5% y Ácido láctico 2% se muestran sensibles, es decir que estas cepas no han desarrollado mecanismos de defensa que las vuelvan resistentes a la acción de estos germicidas.

CAPITULO VI
CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos de la guía de observación demostraron que los puestos de comercialización de espinaca en estudio no cumplen con las condiciones mínimas higiénicas para la comercialización del producto en un 100%; factor que influye en la calidad e higiene del alimento.
2. La bacteria *Listeria sp.* fue aislada del 100% de las muestras de espinaca recolectadas del mercado de Mayoreo La Tiendona.
3. Se aisló e identificó *Listeria monocytogenes* en el 71% de las muestras de espinaca analizadas demostrando así el incumplimiento con el Reglamento Técnico Centroamericano RTCA 67.04.50:08 el cual indica ausencia de *Listeria monocytogenes* en este tipo de alimentos.
4. Las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas presentaron resistencia al hipoclorito de sodio al 1% en un mayor porcentaje que al hipoclorito de sodio al 2%.
5. Las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas presentaron mayor resistencia al Hipoclorito de sodio 1% y 2% y Ácido láctico 1%, mientras que frente al Acido acético 4% y 5% no presentaron resistencia por lo que este germicida es efectivo contra las cepas aisladas de *Listeria monocytogenes*
6. Los germicidas Ácido Láctico 2% y Ácido Acético 4% y 5 % pueden ser utilizados en la industria alimentaria para la eliminación de *Listeria monocytogenes*.
7. El aumento de la resistencia de este microorganismo se debe al uso indiscriminado de germicidas en las hortalizas, ocasionando tolerancia a la bacteria.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Que el inspector de saneamiento monitoree a los comerciantes de espinaca del Mercado de Mayoreo La Tiendona para que mejoren las condiciones higiénicas de los puestos de venta para reducir la posible contaminación del alimento por ***Listeria monocytogenes***.
2. A la administración del Mercado de mayoreo La Tiendona que fomente y mantenga el orden y limpieza en todos los puestos de venta del mercado.
3. Que la población en general emplee Hipoclorito de sodio a concentraciones iguales o mayores del 2% para la desinfección de las hortalizas como la espinaca.
4. A las empresas fabricantes que elaboran productos de limpieza, formular desinfectantes destinados al uso en alimentos con principios activos a base de Ácido láctico 2% y ácido Acético 4 y 5 %.
5. Al Ministerio de Salud gestionar con entidades competentes nuevas normas que sean específicas para verduras y hortalizas ya que el país no cuenta con este tipo de normativas.
6. En futuras investigaciones dar continuidad a este estudio tomando en cuenta otros factores como la presencia de materia orgánica y la variación de las concentraciones de los germicidas de prueba.

BIBLIOGRAFIA

1. Aportela Torres N, Leyva Castillo V, Martino Zagovalov T K, Pereda Lamela G, Puig Pena Y, Valdés Almaral O. **Listeria monocytogenes** como agente causal de ETA. Investigaciones más recientes en Cuba.
2. Asociación de Enfermeras de Salud de la Mujer, de Obstetricia y del Recién Nacido (AWHONN, siglas en inglés), Fundación Internacional del Concejo de Información Alimentaria (IFIC, siglas en inglés), Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, siglas en inglés), Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos (DHHS, siglas en inglés) "La Listeriosis y el Embarazo: ¿Cuál es su Riesgo?" Consultado el 6 de marzo de 2012. Disponible en: <http://www.foodinsight.org/Content/6/La-Listeriosis-y-el-Embarazo-Cual-es-su-Riesgo.pdf>
3. Burrows W. Tratado de Microbiología. Vigésima edición. Editorial Interamericana.
4. Cedillos Ávila, RS; Guerra Rodríguez JC. "Determinación de la multirresistencia microbiana del **Staphiloccocus aureus** aislado a partir de diferentes fuentes que intervienen en la elaboración de queso fresco artesanal proveniente de dos queserías." Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 2012
5. Comisión CodexAlimentarius (2003), "Código Internacional de Practicas recomendado – Principio Generales de Higiene de los Alimentos" (CEAC/RCP 1-1969, Rev 4).

6. Coneman. E. et. al 1997. "Diagnostico microbiológico". Tercera edición. Editorial medica Panamericana México DF. Página 462-465.
7. <http://www.definicionabc.com/salud/hortalizas.php> "Definición de Hortalizas". Consultado el 02 de marzo de 2012.
8. <http://med.javeriana.edu.co/fisiologia/fw/c711.html> "Desinfectantes y antisépticos". Universidad Javeriana. Consultado el 03 de marzo de 2012.
9. <http://www.infoagro.com/hortalizas/espina.htm> "El cultivo de la espinaca". Consultado el 02 de marzo de 2012.
10. www.alkyd.com.ar/pdf/2_.pdf "Elegiendo el adecuado sanitizante y desinfectante" Consultado el 3 de marzo de 2012.
11. Flores Mendoza R P. "Control de calidad y evaluación microbiológica de la potencia germicida del jabón líquido de yodo" Tesis. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia 1998.
12. Garza Velasco R, Monzuazo T S, Hernández Gómez L. "La Listeriosis humana y el ciclo infeccioso asociado a su agente etiológico". Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM. Consultado el 5 de marzo de 2012. Disponible en: <http://depa.fquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Listeria.pdf>
13. Gleicher, N. et al. Tratamiento de las Complicaciones Clínicas del Embarazo – Listeriosis. Editorial Medica Panamericana. 2000

14. González Zorn B, Suáres Rodríguez M. “Seguridad alimentaria. Listeria y Listeriosis”. Centro de vigilancia sanitaria. Madrid, España. Consultado el 5 de marzo de 2012. Disponible en:
<http://www.colvema.org/PDF/5667Listeria.pdf>
15. <http://aminj.myweb.uga.edu/KIRBY-BAUER.html>. “Kirby Bauer Method”. Consultado el 03 de marzo de 2012.
16. <http://www.plantasparacurar.com/la-planta-de-espina/>. “La planta de espina”. Consultado el 02 de marzo de 2012.
17. <http://noticias.starmedia.com/sociedad/listeria-en-melones-estados-unidos-deja-28-muertos.html>. “Listeria en melones de Estados Unidos deja 28 muertos” Consultado el 02 de marzo de 2012.
18. López V L, Romero R J, Ureta V F. “Acción germicida *in vitro* de productos desinfectantes de uso en la industria de alimentos” Universidad de Chile.
19. M. Laura R, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso Alcides. “Brotos de infección por **Listeria monocytogenes**: Una revisión de las vías que llevan a su aparición”. Universidad de Buenos Aires, Argentina .2008
20. Manual de Análisis Bacteriológico (BAM) de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA).
21. Mendenhall, W. Elementos de muestreo, México D.F., Grupo Editorial Iberoamericano. 1987

22. Merck , "Manual de microbiología" 12ª edición
23. Michanie S, "**Listeria monocytogenes**. La bacteria emergente de los 80"
Buenos Aires mayo 2004
24. Oficinas regionales y subregionales de la FAO en América Latina y el Caribe. Conferencia Regional FAO/OMS sobre Inocuidad de los Alimentos para las Américas y el Caribe. Sistemas nacionales de inocuidad de alimentos en las Américas y el Caribe: análisis de la situación. 2005, p.1.
25. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS) "Evaluación de riesgos de **Listeria monocytogenes** en alimentos listos para el consumo". Consultado el 5 de marzo de 2012. Disponible en:
ftp://ftp.fao.org/es/esn/jemra/mra4_es.pdf
26. Oteo J, Alós J I. "Listeria Y LISTERIOSIS" Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Madrid. Consultado el 3 de marzo de 2012. Disponible:
<http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/listeria.pdf>
27. <http://www.botanical-online.com/espinacas.htm>. "Propiedades de la espinaca". Consultado el 04 de marzo de 2012.
28. Remington Farmacia, 20ª edición, Tomo II, Editorial médica Panamericana.
29. http://www.alkyd.com.ar/pdf/8_.pdf . "Resistencia microbiana" Consultado el 14 de marzo de 2012.

30. Rojas Rodríguez C. "Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos crudos de una planta de procesados en Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana.
31. Schöbitz, R. "Importancia epidemiológica de *Listeria monocytogenes* en la industria alimentaria", Chile.
32. Seija V, "Cocos gram positivos: aspectos prácticos". Consultado el 29 de marzo de 2012. Disponible en:
http://www.educa2.madrid.org/cms_tools/files/6046b373-a0b6-4737-8f6b-4553dfefcd53/18.-%20Tablas%20GRAM%20POSITIVOS.pdf
33. Silvana Vero G G. "Métodos para desinfección de frutas y hortalizas". Universidad Pública de Uruguay UDELAR.
34. T. Stuart Walker, Ph.D. Microbiología, McGraw-Hill Interamericana.
35. U.S. Food and drug Administration "FDA" and Center for Food Safety and Applied Nutrition "CFSAN" (2001), "Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazard on fresh and fresh-food produce".
36. "Uso de desinfectantes, Guía para la prevención control y vigilancia epidemiológica de infecciones intrahospitalarias". Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, D. C. Pág. 8.
37. Vazquez Boland JA, Kuhn M, Berche P, et al. "*Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants". CMR. 2001.

38. Zamora, J., "Listeriosis de Origen Alimentario y sus Medidas de Prevención" Universidad Austral de Chile. Consultado el 5 de marzo de 2012. Disponible en:

www.monografias.com/trabajos/listeriosis/listeriosis.shtml

39. Zúñiga A E. et al" La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación". Corporación Editora Médica del Valle Colombia Medica. Vol. 38 N° 2, 2007 (Abril-Junio).

ANEXOS

ANEXO N° 1

MAPA DE UBICACIÓN DEL MERCADO “LA TIENDONA”

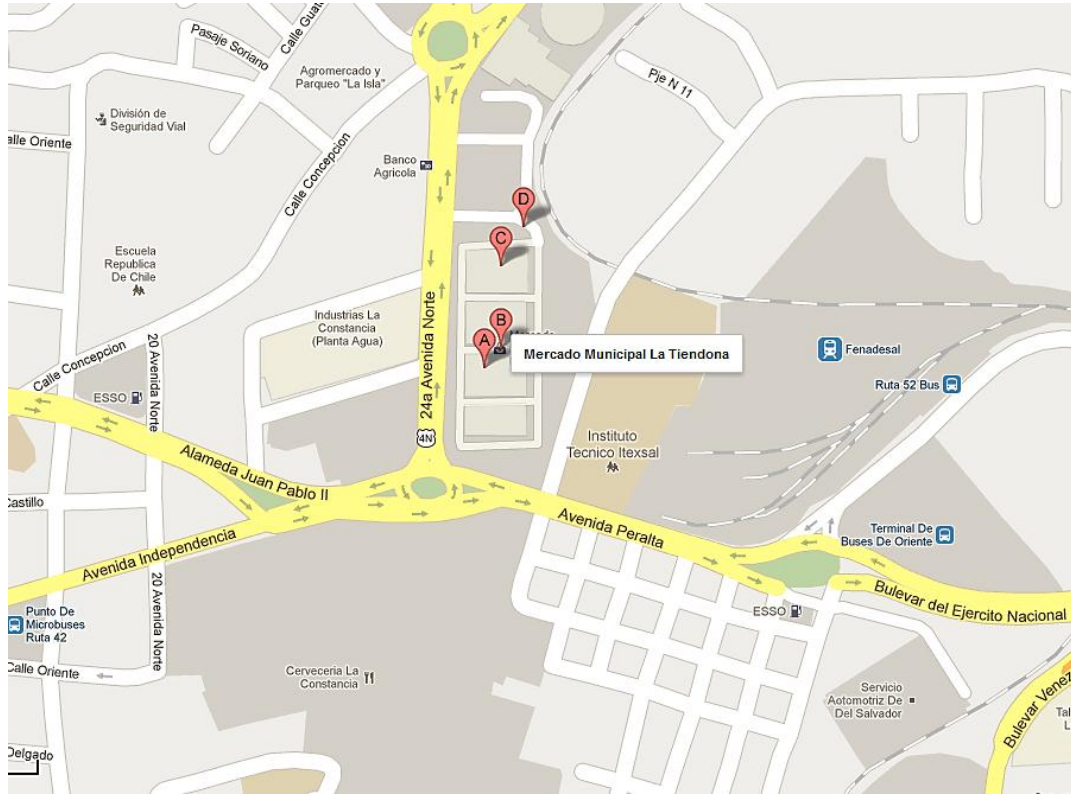


Figura N° 21 Mapa de ubicación del Mercado La Tiendona

ANEXO N° 2
GUIA DE OBSERVACION DE PUESTOS QUE COMERCIALIZAN
ESPINACA EN EL MERCADO LA TIENDONA



Universidad de El Salvador
Facultad de Química y Farmacia



GUIA DE OBSERVACION DE PUESTOS QUE COMERCIALIZAN ESPINACA EN EL MERCADO LA TIENDONA

INDICACION: Observar cuidadosamente los puestos de venta y el personal con el objetivo de evaluar los siguientes parámetros:

1. Puestos del mercado La Tiendona que cuentan con agua potable

Sí _____ No _____

Observaciones:

2. Puestos del mercado La Tiendona que cuenta con sistema de drenaje

Sí _____ No _____

Observaciones:

3. Puestos del mercado La Tiendona que cuentan con depósitos de desecho

Si _____ No _____

Observaciones:

4. Tipo de depósito en que se exhibe el alimento (espinaca) para su comercialización

Mesa: _____ Canasto: _____ Suelo: _____

Observaciones:

5. Tipo de protección que se le da al producto para protegerlo de factores externos

Cubierta con plástico: _____

Cubierta con manta: _____

Nada: _____

Otros: _____

Observaciones:

6. Tipo de almacenamiento que se le da al producto para mantenerlo fresco

7. Vestimenta del comerciante en los puestos de venta

Delantal: _____

Gabacha: _____

Ninguno: _____

Otros: _____

Observaciones:

8. Puestos en los que se observó si rocían con algún producto químico el alimento durante su comercialización.

Sí _____

No _____

Observaciones:

ANEXO N° 3

ESQUEMAS DE PROCEDIMIENTOS: TRATAMIENTO DE MUESTRA

ENRIQUECIMIENTO DE LA MUESTRA



Pesar 25 g de muestra de espinaca asépticamente



225 mL de Caldo enriquecimiento para Listeria LEB



STOMACHER
260 rpm por 3 minutos



Incubar 35 °C por 24-48 h

Figura N° 22 Esquema de enriquecimiento de la muestra

AISLAMIENTO

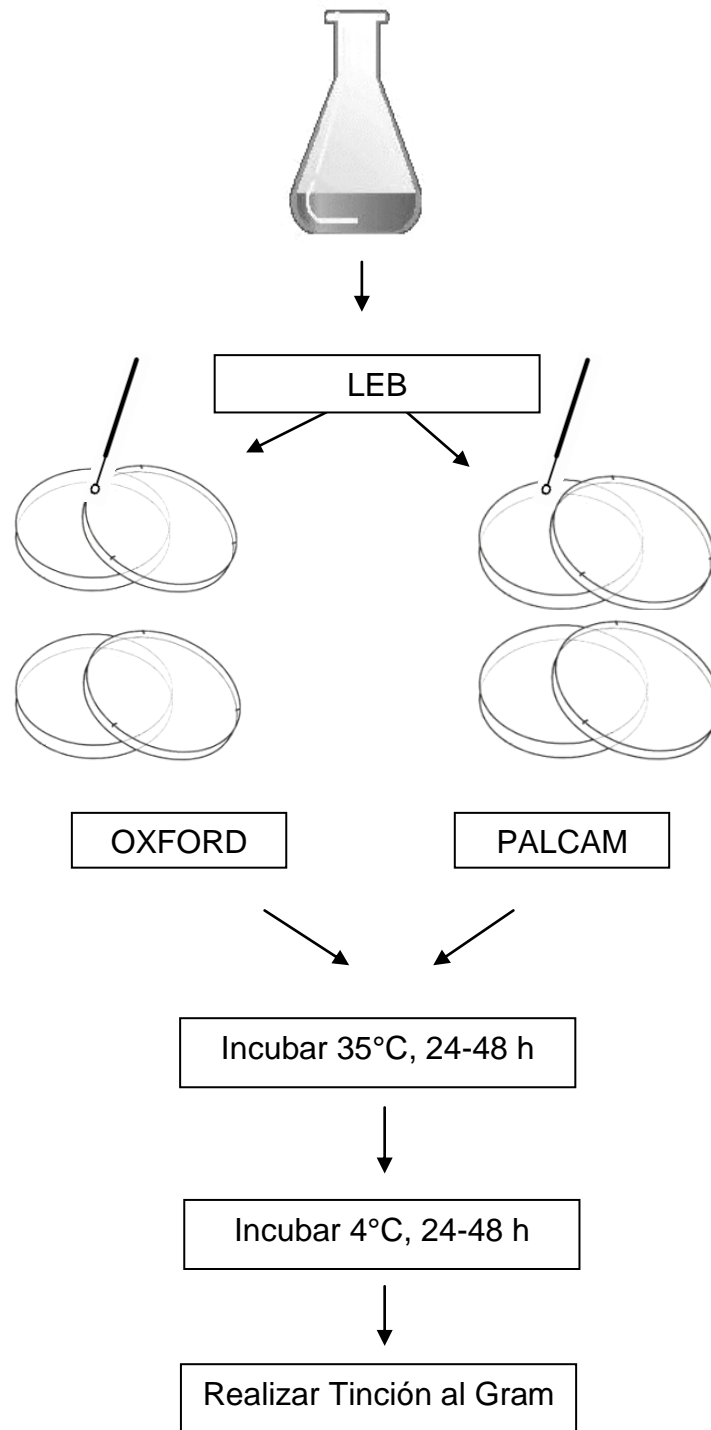


Figura N° 23 Esquema de aislamiento de la cepa

PRUEBAS DE IDENTIFICACION

1) PRUEBAS BIOQUIMICAS

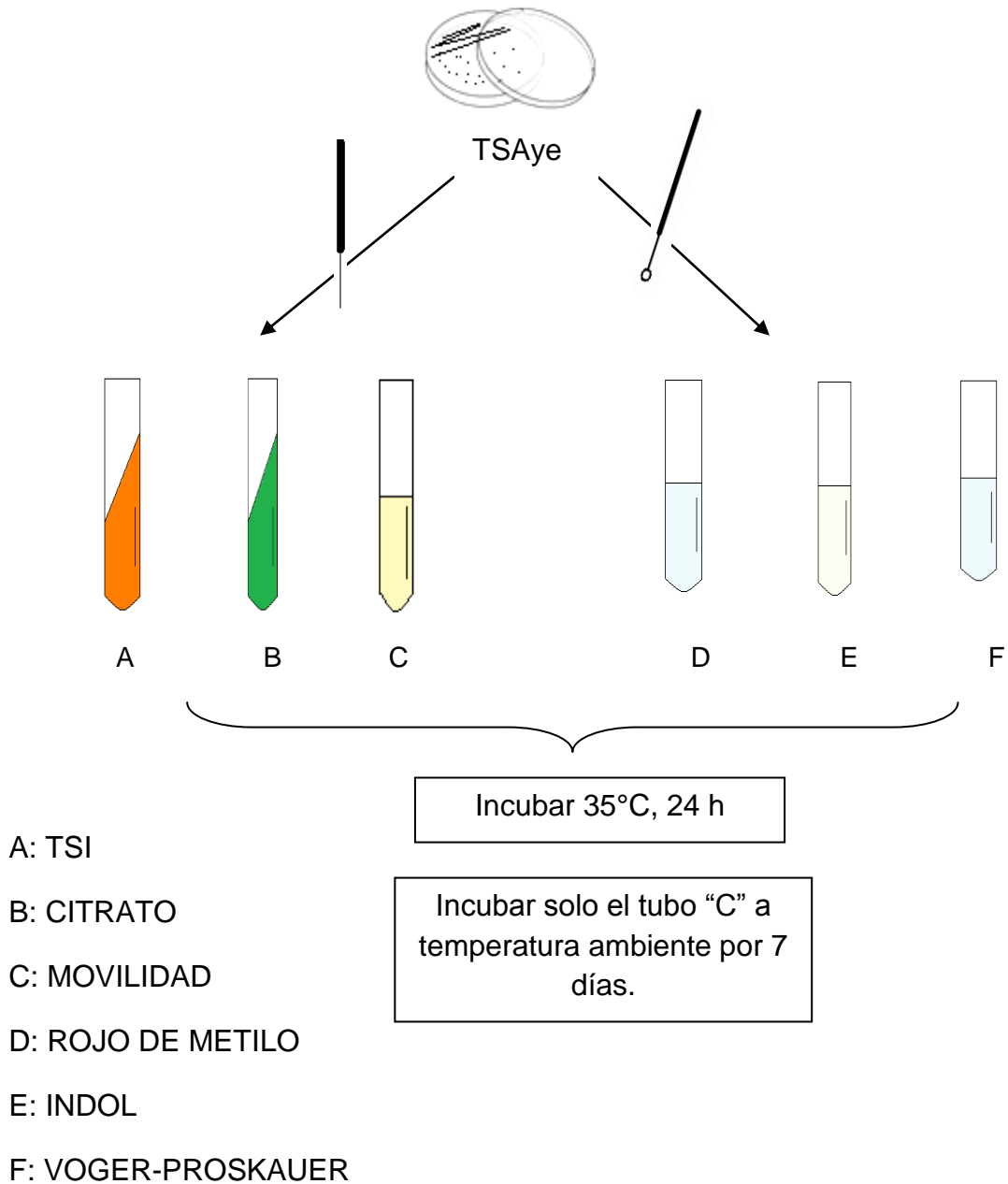


Figura N° 24 Esquema de pruebas bioquímicas

2) CATALASA

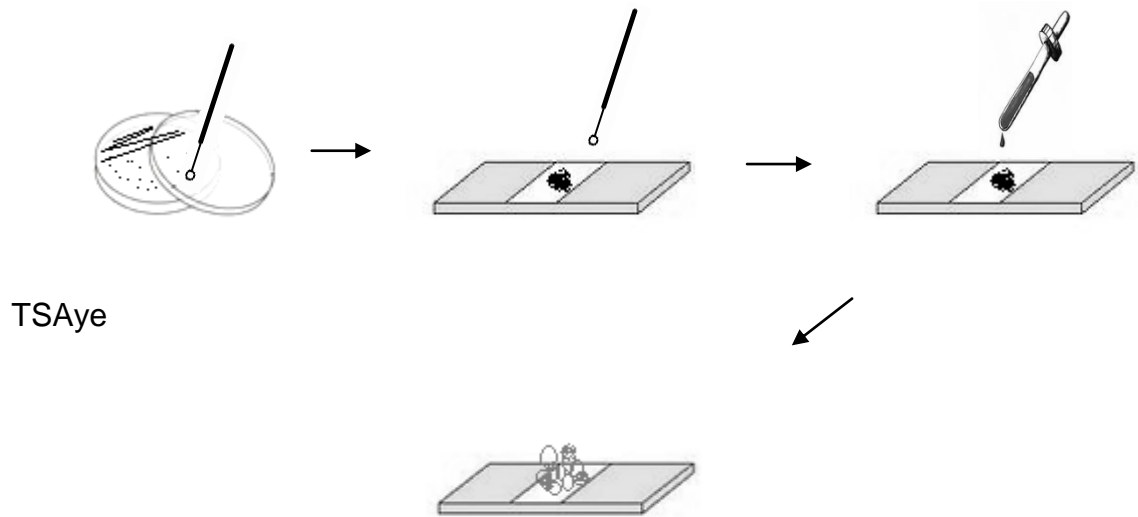


Figura N° 25 Esquema de prueba catalasa

3) HEMOLISIS

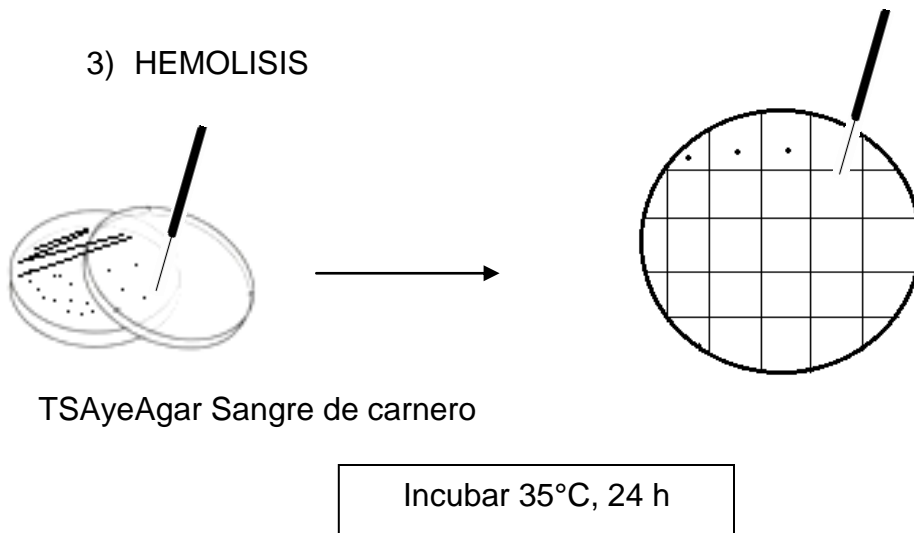


Figura N° 26 Esquema de prueba de Hemólisis

4) PRUEBA CAMP

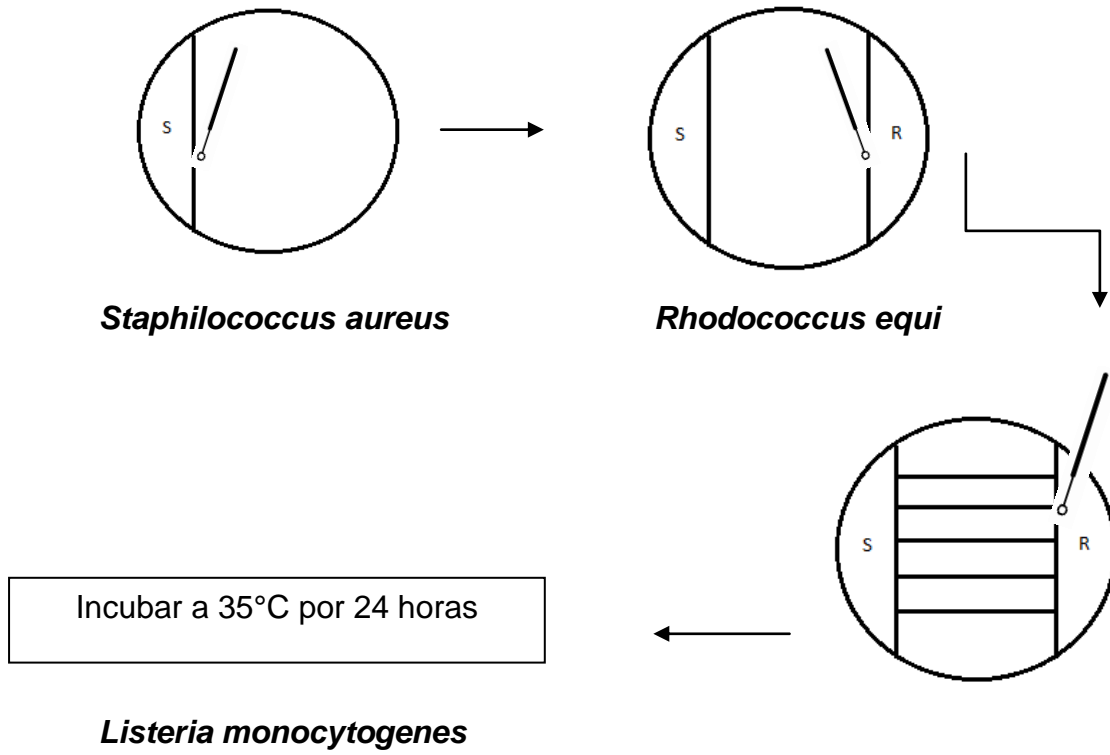


Figura N° 27 Esquema de prueba CAMP

DETERMINACION DE LA RESISTENCIA POR EL MÉTODO KIRBY BAUER MODIFICADO

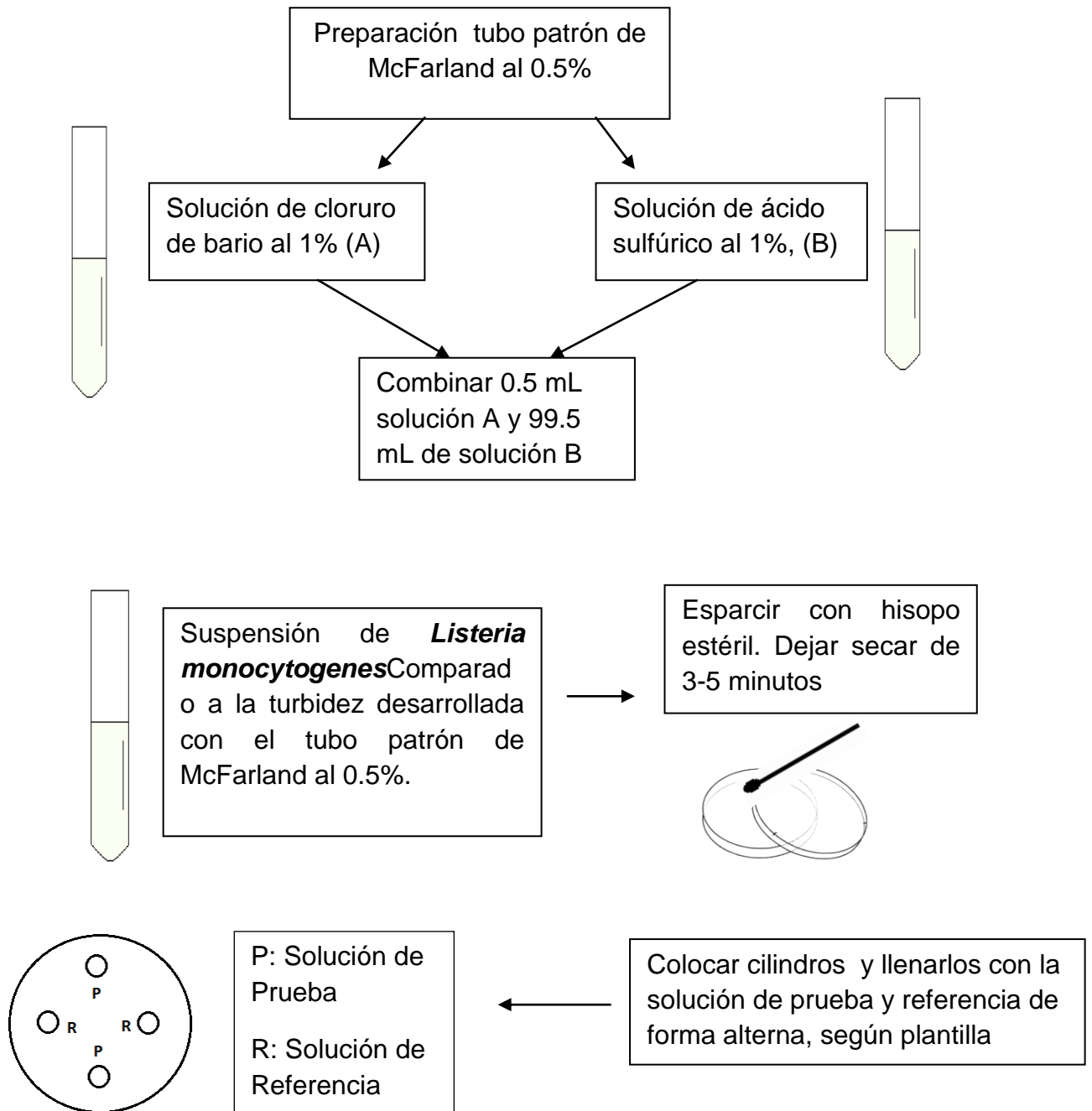
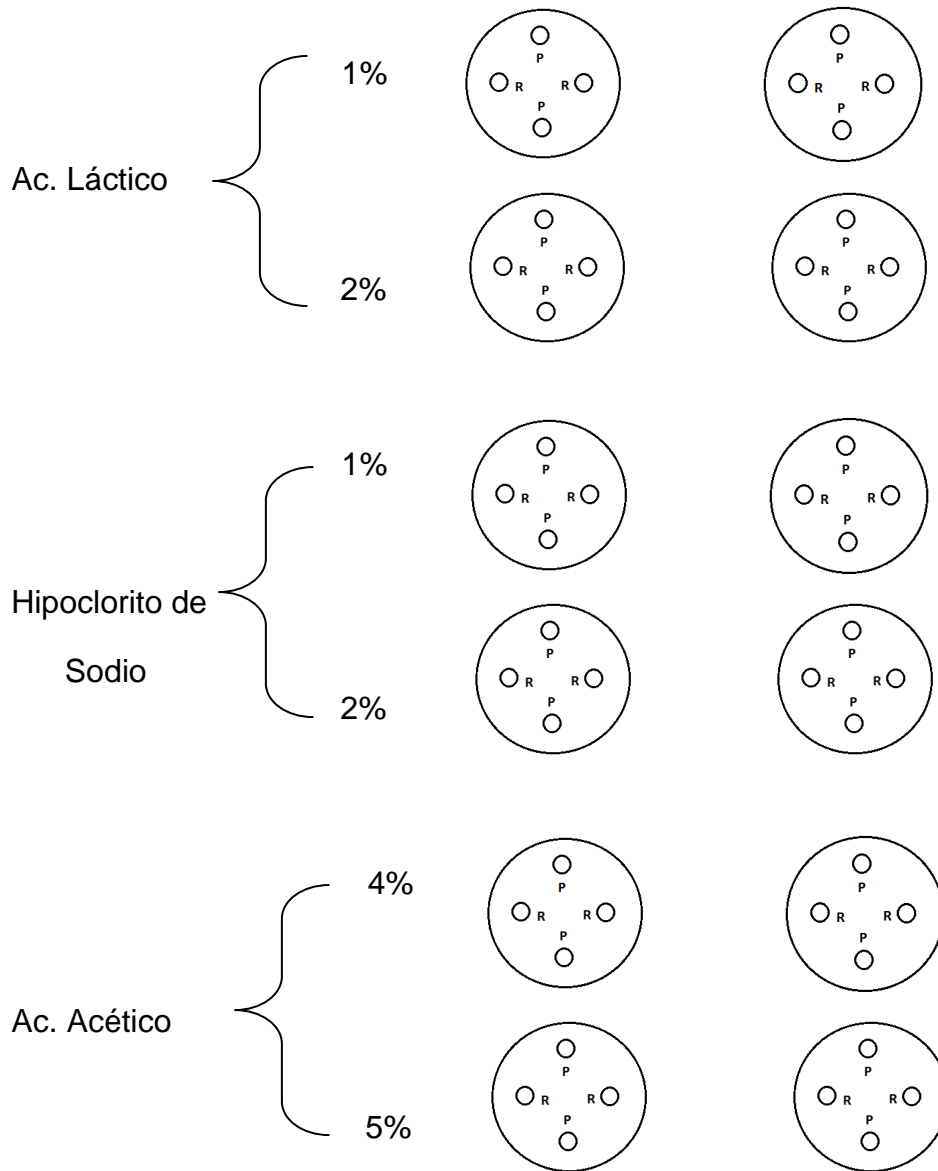


Figura Nº 28 Esquema general del método Kirby Bauer Modificado

ESQUEMA DE GERMICIDAS A ENSAYAR A SUS DIFERENTES CONCENTRACIONES



Incubar todas las placas a 35°C por 24 horas

Figura N° 29 esquema de germicidas a ensayar a sus diferentes concentraciones

ANEXO N° 4

NORMATIVA PARA *Listeria monocytogenes* SEGÚN REGLAMENTO
TECNICO CENTROAMERICANO

Tabla N° 14 Normativa para *Listeria monocytogenes* según RTCA 67.04.50:08

| 4.0 Grupo de alimentos: Frutas y Vegetales. (Incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y <i>áloe vera</i>), algas marinas, nueces y semillas. Esta categoría principal se divide en dos categorías: 04.1 (Frutas) y 04.2 (Hortalizas (incluidos hongos y setas, raíces y tubérculos, legumbres y leguminosas y <i>áloe vera</i>), algas marinas y nueces y semillas). Cada una de estas categorías se dividen a su vez en Subgrupos para productos frescos y elaborados. | | | |
|--|-----------|----------------|-------------------------|
| 4.1 Subgrupo del alimento: Frutas y vegetales frescos | | | |
| Parámetro | Categoría | Tipo de riesgo | Límite máximo permitido |
| <i>Salmonella spp</i> /25g | 10 | C | Ausencia |
| Coliformes fecales | 5 | | 93NMP/g |
| <i>Escherichia coli</i> | 10 | | < 3 NMP/g |
| <i>Listeria monocytogenes</i> /25g (solo para vegetales) | 10 | | Ausencia |

ANEXO N° 5

Tabla N° 15 Medidas de halos de inhibición producidos por solución de yodo 2% frente a *Listeria Monocytogenes* cepa ATCC 18952.

| Placa | Halos de inhibición (mm) |
|----------|--------------------------|
| 1 | 32.9 |
| | 34.3 |
| 2 | 34.3 |
| | 34.4 |
| Total | 135.9 |
| Promedio | 33.975 \approx 34 |

Tomando en cuenta los halos de inhibición producidos por la solución de yodo 2% (patrón de referencia) y relacionando los diámetros de los halos de inhibición obtenidos para cada uno de los desinfectantes se presenta la siguiente clasificación de la sensibilidad.

≤ 16 Resistente

17-19 Intermedio

≥ 20 Sensible

ANEXO N° 6

SIMBOLOGIA DE RESULTADOS DE PRUEBAS REALIZADAS

A continuación se presentan los diferentes signos y abreviaturas que son utilizadas en los cuadros de resultados, los cuales se interpretan de la siguiente manera.

Signos:

Aislamiento (+): presencia de colonias de color gris con halo negro en los medios selectivos (Oxford y Palcam).

Pruebas bioquímicas

Catalasa (+): producción de burbujeo al agregar H_2O_2 al 3 %

Hemólisis (+): presencia de α hemólisis.

CAMP (+): formación de flecha.

Movilidad (Mov) (+): formación de una especie de sombrilla.

TSI (+): fermentación de azúcares (A/A) sin producción de H_2S .

Indol (-): no presenta formación de anillo de color.

(VP) VogesProskauer (+): formación de anillo de color rojo.

(RM) rojo de Metilo (+): cambio a color rojo al agregar el reactivo.

ANEXO N° 7

RESULTADO DE IDENTIFICACION DE *Listeria monocytogenes* EN
LOS MUESTREOS REALIZADOS

PRUEBA PILOTO

Se realizó en dos semanas

Primera semana de muestreo

En esta semana se analizaron 7 muestras de espinaca

Tabla N°16 Resultado de Pruebas Bioquímicas de muestras de espinaca analizadas en la primera semana de muestreo

| Muestras | Crecimiento en medios selectivos | Pruebas bioquímicas | | | | | |
|----------|----------------------------------|---------------------|-----|-----|----|----|---|
| | | Citrato | TSI | Mov | VP | RM | I |
| 1 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 2 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 3 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 4 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 5 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 6 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 7 | + | - | A/A | + | + | + | - |

Tabla N° 17 Resultado de otras pruebas de identificación en muestras analizadas en la primera semana de muestreo

| Muestras | Catalasa | Hemólisis | CAMP | |
|----------|----------|-----------|------------------|----------------|
| | | | <i>S. aureus</i> | <i>R. equi</i> |
| 1 | + | + | + | |
| 2 | + | + | + | |
| 3 | + | + | + | |
| 4 | + | + | + | |
| 5 | + | + | + | |
| 6 | + | + | + | |
| 7 | + | + | + | |

Las tablas N° 16 y 17 muestran que en la primera semana de muestreo todas las muestras de espinaca analizadas contenían cepas de *Listeria monocytogenes*

Segunda semana de muestreo

En esta semana se analizaron 8 muestras de espinaca

Tabla N°18 Resultado de Pruebas Bioquímicas en muestras analizadas en la segunda semana de muestreo

| Muestras | Crecimiento en medios selectivos | Pruebas bioquímicas | | | | | |
|----------|----------------------------------|---------------------|-----|-----|----|----|---|
| | | Citrato | TSI | Mov | VP | RM | I |
| 8 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 9 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 10 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 11 | + | + | K/A | - | + | - | + |
| 12 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 13 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 14 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 15 | + | - | A/A | + | + | + | - |

Tabla N°19 Resultado de otras pruebas de identificación Bioquímicas en muestras analizadas en la segunda semana de muestreo

| Muestras | Catalasa | Hemólisis | CAMP | |
|----------|----------|-----------|------------------|----------------|
| | | | <i>S. aureus</i> | <i>R. equi</i> |
| 8 | + | + | + | |
| 9 | + | + | + | |
| 10 | + | + | + | |
| 11 | - | + | | + |
| 12 | + | + | + | |
| 13 | + | + | + | |
| 14 | + | + | + | |
| 15 | + | + | + | |

Las tablas N° 18 y 19 muestran que de las ocho muestras analizadas durante la segunda semana de muestreo, todas contenían cepas del genero *Listeria* sin embargo solo 7 cepas corresponden a *Listeria monocytogenes* que fueron encontradas en las muestras de la 8 a la 10 y de la 12 a la 15. La cepa encontrada en la muestra once no corresponde a *Listeria monocytogenes*.

Tercera semana de muestreo

En esta semana se analizaron las muestras faltantes para completar el número total de cepas que es de 24 muestras.

Tabla N°20 Resultado de Pruebas Bioquímicas en muestras analizadas en la tercera semana de muestreo

| Muestras | Crecimiento en medios selectivos | Pruebas bioquímicas | | | | | |
|----------|----------------------------------|---------------------|-----|-----|----|----|---|
| | | Citrato | TSI | Mov | VP | RM | I |
| 16 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 17 | + | + | K/A | - | + | - | - |
| 18 | + | - | A/K | - | - | - | - |
| 19 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 20 | + | - | K/A | - | + | - | - |
| 21 | + | - | A/A | - | - | - | + |
| 22 | + | - | A/A | + | + | + | - |
| 23 | + | + | K/K | - | + | - | + |
| 24 | + | - | A/A | + | + | - | + |

Tabla N° 21 Resultado de otras pruebas de identificación en muestras analizadas en la tercera semana de muestreo

| Muestras | Catalasa | Hemólisis | CAMP | |
|----------|----------|-----------|------------------|----------------|
| | | | <i>S. aureus</i> | <i>R. equi</i> |
| 16 | + | + | + | |
| 17 | + | + | | + |
| 18 | - | + | | + |
| 19 | + | + | + | |
| 20 | + | + | | + |
| 21 | + | + | | + |
| 22 | + | + | + | |
| 23 | + | + | | + |
| 24 | - | + | | + |

Las tablas N° 20 y 21 muestran que de 9 muestras analizadas durante la tercera semana de muestreo únicamente las cepas aisladas de la muestra 19 y 22 corresponden con ***Listeria monocytogenes***.

NOTA: Se realizó tinción al Gram de todas las colonias sospechosas en agar TSAye, en todos los frotis realizados se observó que la morfología de la bacteria era de un cocobacilo Gram (+).

ANEXO N° 8

TABLAS DE HALOS PRODUCIDOS POR LOS GERMICIDAS DE
PRUEBA FRENTE A CEPAS DE *Listeria monocytogenes* AISLADA DE
LA MUESTRAS ANALIZADAS

Tabla N° 22 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 1

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 13.90 14.80 | 14.00 13.75 |
| | 2% | 20.30 21.75 | 20.50 19.95 |
| Ácido Láctico | 1% | 10.90 10.85 | 11.10 10.95 |
| | 2% | 11.95 11.20 | 11.45 10.90 |
| Ácido Acético | 4% | 32.30 33.75 | 32.60 34.65 |
| | 5% | 39.65 41.05 | 39.90 39.90 |

Tabla N° 23 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 2

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 10.75 10.50 | 10.30 11.10 |
| | 2% | 11.95 11.40 | 11.75 12.05 |
| Ácido Láctico | 1% | 17.05 17.80 | 18.75 18.25 |
| | 2% | 21.55 22.55 | 19.45 19.40 |
| Ácido Acético | 4% | 45.40 45.00 | 44.00 46.65 |
| | 5% | 48.80 47.20 | 49.10 47.55 |

Tabla N° 24 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 3

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 16.20 17.0 | 17.55 16.00 |
| | 2% | 27.90 27.85 | 26.20 26.20 |
| Ácido Láctico | 1% | 19.40 20.00 | 18.10 17.80 |
| | 2% | 21.30 20.40 | 20.40 19.65 |
| Ácido Acético | 4% | 43.20 41.60 | 42.85 42.60 |
| | 5% | 44.70 46.25 | 45.75 44.05 |

Tabla N° 25 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 4

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 19.45 19.30 | 18.90 19.60 |
| | 2% | 20.70 19.30 | 19.40 18.50 |
| Ácido Láctico | 1% | 19.55 28.25 | 21.05 22.30 |
| | 2% | 21.80 22.20 | 20.75 20.60 |
| Ácido Acético | 4% | 39.30 37.20 | 38.90 37.75 |
| | 5% | 42.15 42.80 | 43.55 42.30 |

Tabla N° 26 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 5

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 17.55 18.25 | 16.95 17.70 |
| | 2% | 18.00 18.95 | 17.75 18.95 |
| Ácido Láctico | 1% | 12.65 13.00 | 12.30 12.00 |
| | 2% | 20.45 20.90 | 19.95 21.00 |
| Ácido Acético | 4% | 29.95 29.85 | 31.65 32.40 |
| | 5% | 39.55 38.65 | 38.55 38.45 |

Tabla N° 27 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 6

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 15.65 15.15 | 15.45 14.95 |
| | 2% | 17.45 16.00 | 16.55 16.65 |
| Ácido Láctico | 1% | 16.85 15.90 | 14.50 14.75 |
| | 2% | 20.50 19.75 | 20.25 19.95 |
| Ácido Acético | 4% | 42.55 42.00 | 43.00 43.15 |
| | 5% | 47.25 48.75 | 47.75 46.95 |

Tabla N° 28 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 7

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 10.25 10.85 | 11.10 11.05 |
| | 2% | 10.90 11.30 | 11.65 11.70 |
| Ácido Láctico | 1% | 16.55 17.25 | 16.15 15.95 |
| | 2% | 20.35 18.55 | 17.85 17.00 |
| Ácido Acético | 4% | 43.05 45.75 | 44.15 45.20 |
| | 5% | 52.25 51.60 | 50.75 52.35 |

Tabla N° 29 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 8

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 11.75 10.55 | 10.35 10.95 |
| | 2% | 15.00 16.45 | 14.00 14.00 |
| Ácido Láctico | 1% | 17.00 18.25 | 17.75 17.25 |
| | 2% | 23.00 24.35 | 23.90 22.75 |
| Ácido Acético | 4% | 34.00 35.95 | 35.75 36.85 |
| | 5% | 37.85 37.95 | 37.55 40.00 |

Tabla N° 30 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 9

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 16.65 16.35 | 16.25 16.65 |
| | 2% | 19.45 19.85 | 19.95 18.65 |
| Ácido Láctico | 1% | 16.25 17.25 | 16.35 16.95 |
| | 2% | 21.00 21.95 | 20.45 21.75 |
| Ácido Acético | 4% | 35.35 34.65 | 35.35 35.25 |
| | 5% | 39.95 39.00 | 38.55 37.00 |

Tabla N° 31 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 10

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 17.95 17.00 | 18.35 17.00 |
| | 2% | 21.75 20.95 | 21.25 21.00 |
| Ácido Láctico | 1% | 20.75 21.45 | 20.75 21.00 |
| | 2% | 26.85 26.45 | 25.15 26.90 |
| Ácido Acético | 4% | 36.20 35.95 | 35.85 35.05 |
| | 5% | 39.75 40.05 | 39.95 40.35 |

Tabla N° 32 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 12

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 13.10 13.55 | 13.55 13.55 |
| | 2% | 22.65 22.40 | 22.95 22.65 |
| Ácido Láctico | 1% | 17.80 17.10 | 16.95 16.75 |
| | 2% | 20.40 21.95 | 20.40 21.35 |
| Ácido Acético | 4% | 39.25 41.35 | 40.10 42.60 |
| | 5% | 44.55 45.30 | 45.05 45.55 |

Tabla N° 33 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 13

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|----------------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 13.20 13.20 | 14.55 14.30 |
| | 2% | 16.55 15.00 | 16.85 14.40 |
| Ácido Láctico | 1% | 15.75 16.85 | 16.40 16.55 |
| | 2% | 18.40 18.35 | 17.75 17.40 |
| Ácido Acético | 4% | 30.90 30.90 | 31.50 32.75 |
| | 5% | 37.30 36.30 | 36.75 37.20 |

Tabla N° 34 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 14

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|---------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 15.50 | 15.00 |
| | | 15.75 | 15.25 |
| | 2% | 20.05 | 19.90 |
| | | 20.95 | 20.05 |
| Ácido Láctico | 1% | 15.35 | 16.75 |
| | | 16.00 | 17.85 |
| | 2% | 25.65 | 24.85 |
| | | 25.50 | 24.90 |
| Ácido Acético | 4% | 40.05 | 41.55 |
| | | 41.35 | 42.05 |
| | 5% | 44.10 | 43.75 |
| | | 44.25 | 44.30 |

Tabla N° 35 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 15

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|---------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 13.00 | 14.60 |
| | | 13.90 | 14.00 |
| | 2% | 20.65 | 20.00 |
| | | 20.00 | 19.80 |
| Ácido Láctico | 1% | 19.65 | 18.20 |
| | | 19.45 | 17.80 |
| | 2% | 22.00 | 21.75 |
| | | 20.15 | 21.30 |
| Ácido Acético | 4% | 33.00 | 34.20 |
| | | 34.80 | 33.70 |
| | 5% | 43.10 | 42.55 |
| | | 44.00 | 43.90 |

Tabla N° 36 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 16

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|---------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 13.70 | 12.90 |
| | | 13.05 | 22.85 |
| | 2% | 23.35 | 22.85 |
| | | 23.05 | 23.35 |
| Ácido Láctico | 1% | 19.95 | 18.30 |
| | | 19.00 | 21.00 |
| | 2% | 21.00 | 23.35 |
| | | 22.90 | 22.00 |
| Ácido Acético | 4% | 33.00 | 32.50 |
| | | 33.85 | 33.40 |
| | 5% | 39.17 | 40.15 |
| | | 40.00 | 38.95 |

Tabla N° 37 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 19

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|---------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 15.00 | 16.80 |
| | | 15.75 | 15.60 |
| | 2% | 23.60 | 24.00 |
| | | 23.05 | 23.40 |
| Ácido Láctico | 1% | 16.00 | 16.20 |
| | | 17.80 | 16.90 |
| | 2% | 22.70 | 22.05 |
| | | 21.05 | 21.90 |
| Ácido Acético | 4% | 42.00 | 42.20 |
| | | 43.90 | 42.80 |
| | 5% | 56.30 | 55.90 |
| | | 57.65 | 55.00 |

Tabla N° 38 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa de *Listeria monocytogenes* aislada de la muestra N° 22

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|---------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 19.20 | 17.90 |
| | | 18.70 | 18.15 |
| | 2% | 23.30 | 21.75 |
| | | 22.90 | 20.00 |
| Ácido Láctico | 1% | 21.00 | 21.70 |
| | | 19.80 | 19.00 |
| | 2% | 21.30 | 22.80 |
| | | 22.00 | 22.45 |
| Ácido Acético | 4% | 43.00 | 41.90 |
| | | 42.10 | 41.55 |
| | 5% | 47.20 | 48.95 |
| | | 48.05 | 49.60 |

Tabla N° 39 Halos producidos por los germicidas de prueba frente a cepa control de *Listeria monocytogenes* ATCC 18952

| Germicida | Concentración | Halos producidos (mm) | |
|----------------------|---------------|-----------------------|---------|
| | | Placa 1 | Placa 2 |
| Hipoclorito de sodio | 1% | 16.05 | 16.35 |
| | | 15.90 | 16.20 |
| | 2% | 17.40 | 17.65 |
| | | 16.95 | 17.45 |
| Ácido Láctico | 1% | 17.80 | 16.45 |
| | | 17.35 | 16.95 |
| | 2% | 20.00 | 19.70 |
| | | 20.95 | 21.30 |
| Ácido Acético | 4% | 35.00 | 36.90 |
| | | 36.75 | 36.20 |
| | 5% | 42.25 | 43.00 |
| | | 43.85 | 41.20 |

ANEXO N° 9

TABLAS DE SENSIBILIDAD DE CEPAS AISLADAS DE *Listeria*
monocytogenes FRENTE A GERMICIDAS DE PRUEBA

Tabla N° 40 Sensibilidad de cepas aisladas de *Listeria monocytogenes* frente a Hipoclorito de sodio 1% y 2 %

| Hipoclorito de sodio | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------|----------|------------|----------|----------|----------|------------|----------|
| Diámetro de halos en milímetros (mm) | | | | | | | | |
| 1% | | | | | 2% | | | |
| Muestra | Promedio | R ≤16 | I 17-19 | S ≥20 | Promedio | R ≤16 | I 17-19 | S ≥20 |
| 1 | 14.11 | + | - | | 20.63 | - | - | + |
| 2 | 10.66 | + | - | - | 11.79 | + | - | - |
| 3 | 16.69 | + | - | - | 27.04 | - | - | + |
| 4 | 19.31 | - | + | - | 19.48 | - | + | - |
| 5 | 17.61 | - | + | - | 18.41 | - | + | - |
| 6 | 15.30 | + | - | - | 16.66 | + | - | - |
| 7 | 10.81 | + | - | - | 11.39 | + | - | - |
| 8 | 10.90 | + | - | - | 14.86 | + | - | - |
| 9 | 16.48 | + | - | - | 19.48 | - | + | - |
| 10 | 17.58 | - | + | - | 21.24 | - | - | + |
| 12 | 13.44 | + | - | - | 22.41 | - | - | + |
| 13 | 13.81 | + | - | - | 15.70 | + | - | - |
| 14 | 15.38 | + | - | - | 20.23 | - | - | + |
| 15 | 13.88 | + | - | - | 20.11 | - | - | + |
| 16 | 13.13 | + | - | - | 23.15 | - | - | + |
| 19 | 15.79 | + | - | - | 23.51 | - | - | + |
| 22 | 15.79 | + | - | - | 23.51 | - | - | + |

R: Resistente; I: Intermedio; S: sensible

Tabla N° 41 Sensibilidad de cepas aisladas de *Listeria monocytogenes* frente a Ácido Láctico 1% y 2 %

| Ácido Láctico | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------|----------|------------|----------|----------|----------|------------|----------|
| Diámetro de halos en milímetros (mm) | | | | | | | | |
| 1% | | | | | 2% | | | |
| Muestra | Promedio | R ≤16 | I 17-19 | S ≥20 | Promedio | R ≤16 | I 17-19 | S ≥20 |
| 1 | 10.95 | + | - | - | 11.38 | + | | - |
| 2 | 17.96 | - | + | - | 20.73 | - | - | + |
| 3 | 18.83 | - | + | - | 20.44 | - | - | + |
| 4 | 20.29 | - | - | + | 21.34 | - | - | + |
| 5 | 12.56 | + | - | - | 20.58 | - | - | + |
| 6 | 15.50 | + | - | - | 20.11 | - | - | + |
| 7 | 16.48 | + | - | - | 18.44 | - | + | - |
| 8 | 17.56 | - | + | - | 23.50 | - | - | + |
| 9 | 16.70 | + | - | - | 21.29 | - | - | + |
| 10 | 20.98 | - | - | + | 26.34 | - | - | + |
| 12 | 17.15 | - | + | - | 21.03 | - | - | + |
| 13 | 16.39 | + | - | - | 17.98 | - | + | - |
| 14 | 16.49 | + | - | - | 25.23 | - | - | + |
| 15 | 18.78 | - | + | - | 21.30 | - | - | + |
| 16 | 19.56 | - | + | - | 22.31 | - | - | + |
| 19 | 16.73 | + | - | - | 21.93 | - | - | + |
| 22 | 16.73 | + | - | - | 21.93 | - | - | + |

R: Resistente; I: Intermedio; S: sensible

Tabla N° 42 Sensibilidad de cepas aisladas de *Listeria monocytogenes* frente a Ácido Acético 4% y 5 %

| Ácido Acético | | | | | | | | |
|--------------------------------------|----------|----------|------------|----------|----------|----------|------------|----------|
| Diámetro de halos en milímetros (mm) | | | | | | | | |
| 4% | | | | | 5% | | | |
| Muestra | Promedio | R ≤16 | I 17-19 | S ≥20 | Promedio | R ≤16 | I 17-19 | S ≥20 |
| 1 | 33.34 | - | - | + | 40.13 | - | - | + |
| 2 | 45.56 | - | - | + | 48.16 | - | - | + |
| 3 | 42.56 | - | - | + | 45.19 | - | - | + |
| 4 | 38.28 | - | - | + | 42.70 | - | - | + |
| 5 | 30.96 | - | - | + | 38.83 | - | - | + |
| 6 | 42.68 | - | - | + | 47.68 | - | - | + |
| 7 | 44.54 | - | - | + | 51.74 | - | - | + |
| 8 | 35.63 | - | - | + | 38.34 | - | - | + |
| 9 | 35.15 | - | - | + | 38.63 | - | - | + |
| 10 | 36.01 | - | - | + | 40.03 | - | - | + |
| 12 | 40.83 | - | - | + | 45.11 | - | - | + |
| 13 | 31.51 | - | - | + | 36.88 | - | - | + |
| 14 | 41.25 | - | - | + | 44.10 | - | - | + |
| 15 | 33.93 | - | - | + | 43.39 | - | - | + |
| 16 | 33.19 | - | - | + | 39.57 | - | - | + |
| 19 | 42.73 | - | - | + | 56.21 | - | - | + |
| 22 | 42.73 | - | - | + | 56.21 | - | - | + |

R: Resistente; I: Intermedio; S: sensible

ANEXO N° 10

ENRIQUECIMIENTO Y AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* EN
MEDIOS SELECTIVOS



Figura N° 30 Enriquecimiento de muestras de espinaca en Caldo de Enriquecimiento para *Listeria* (LEB)



Figura N° 31 Aislamiento de *Listeria* en agar PALCAM y OXFORD

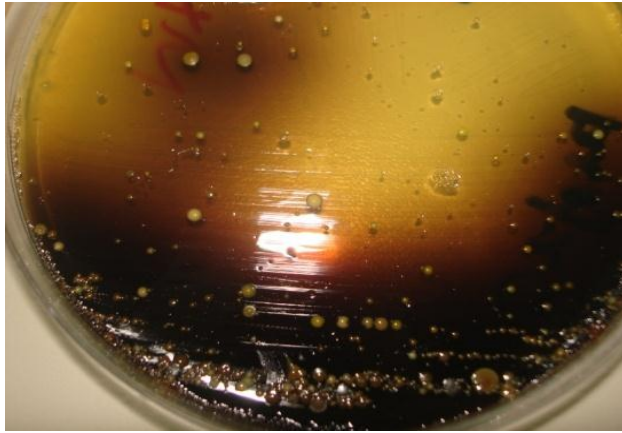


Figura N° 32 Colonias sospechosas de *Listeria monocytogenes*

ANEXO N° 11
IDENTIFICACION DE *Listeria monocytogenes*



Figura N° 33 Pruebas bioquímicas para la identificación de cepa *Listeria monocytogenes* aislada a partir de muestra de espinaca



Figura N° 34 Prueba CAMP para la identificación de cepa de *Listeria monocytogenes*

ANEXO N° 12

PRUEBA DE SENSIBILIDAD PARA LAS CEPAS DE *Listeria monocytogenes* POR EL METODO KIRBY BAUER MODIFICADO



Figura N° 35 Germicidas de prueba y solución patrón (yodo 2%)

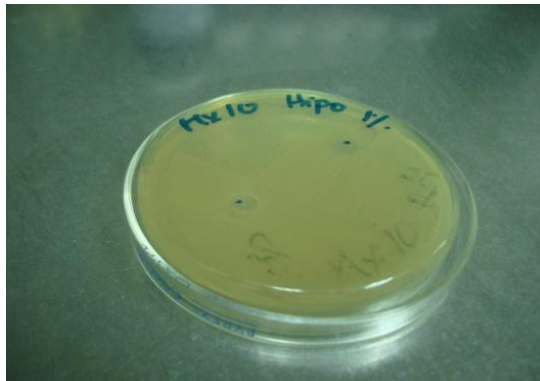


Figura N° 36 Halos producidos por Hipoclorito de sodio 1% en cepa de *Listeria monocytogenes*

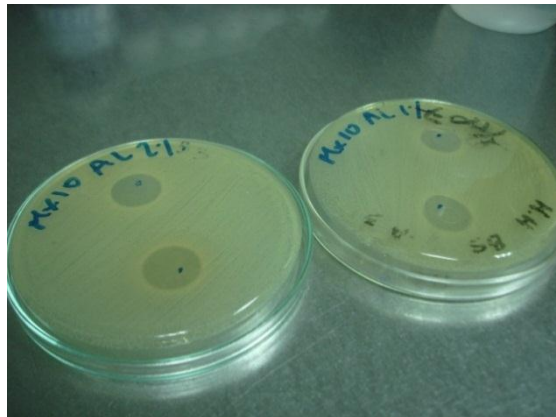


Figura N° 37 Halos producidos por Ácido láctico al 1 y 2 % en cepa de *Listeria monocytogenes*



Figura N° 38 Halos producidos por Ácido Acético al 4 y 5 % en cepa de *Listeria monocytogenes*

ANEXO N° 13

PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS Y SU
COMPOSICION

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS Y SU COMPOSICION ⁽²²⁾

CALDO DE ENRIQUECIMIENTO PARA *Listeria*

- Composición (g/L)

Peptona de caseína 17.0; peptona de harina de soya 3.0; D(+) Glucosa 2.5; cloruro de sodio 5.0; fosfato de hidrogeno di potásico 2.5; extracto de levadura 6.0; acriflavina 0.010; cloheximida 0.05; ácido nalidixico 0.04.

- Preparación:

Suspender 36.1 g en 1 litro de agua desmineralizada. Tratar en autoclave (15 minutos por 121 °C).

AGAR SELECTIVO BASE PARA *Listeria* OXFORD

- Composición (g/L)

Peptona 23.0; almidón 31.0; cloruro de sodio 5.0; agar-agar 13.0; esculina 1.0; citrato amonio hierro III 0.5; cloruro de litio 15.0

- Preparación:

Suspender 29.25 g en 0.5 litros de agua desmineralizada. Tratar en autoclave (15 minutos por 121 °C). Disolver 1 vial de Suplemento selectivo Oxford Liseria adicionando 5 mL de una mezcla de etanol y agua destilada esteril 1:1. Verter el contenido del vial en el medio a una temperatura de 50 °C. Verter el medio en placas y dejar solidificar.

AGAR SELECTIVO BASE PARA *Listeria* PALCAM ⁽²²⁾

- Composición (g/L)

Peptona 23.0; extracto de levadura 3.0; cloruro de sodio 5.0; agar-agar 13.0;

D(-) Manitol 10.0; citrato amonio hierro III 0.5; esculina 0.8; glucosa 0.5 cloruro de litio 15.0;Rojo fenol 0.08

- Preparación:

Suspender 35.9 g en 0.5 litros de agua desmineralizada. Tratar en autoclave (15 minutos por 121 °C). Disolver 1 vial de Suplemento selectivo Palcam *Listeria* adicionando 1 mL de agua destilada estéril 1:1. Verter el contenido del vial en el medio a una temperatura de 50 °C. Verter el medio en placas y dejar solidificar.

TRIPTICASA SOYA AGAR MAS EXTRACTO DE LEVADURA

- Composición (g/L)

Peptona de caseína 15.0; peptona de harina de soya 5.0; cloruro de sodio 5.0; agar-agar 15.0; extracto de levadura 2.0

- Preparación:

Suspender 40 g de agar tripticasa soya más 2 g de extracto de levadura en 1 litro de agua desmineralizada. Tratar en autoclave (15 minutos por 121 °C).

CALDO ROJO DE METILO-VOGES-PROSKAUER

- Composición (g/L)

Peptona de soya 7.0; D(+) glucosa 5.0; buffer fosfato 5.0

- Preparación:

Suspender 17 g en 1 litro de agua desmineralizada. Dispensar alícuotas de 5mL en tubos. Tratar en autoclave (15 minutos por 121 °C).

AGUA DE TRIPTONA

- Composición (g/L):

Peptona de caseína 10.0, cloruro de sodio 5.0

- Preparación:

Disolver 15g en un litro de agua desmineralizada, dispensar en tubos y autoclavar a 121 °C por 15 minutos.

TRIPLE AZÚCAR HIERRO (TSI)

- Composición (g/L):

Peptona de caseína 15.0; peptona de carne 5.0; extracto de carne 3.0; extracto de levadura 3.0; cloruro de sodio 5.0; lactosa 10.0; sucrosa 10.0; D-glucosa 1.0; citrato de amonio hierro(III) 0.5; tiosulfato de sodio 0.5; rojo de fenol 0.024; agar-agar 12.0.

- Preparación:

Disolver 65g en un litro de agua desmineralizada, dispensar en tubos de ensayo, autoclavar a 121°C por 15 minutos. Inclinar los tubos y dejar que el medio se solidifique.

MEDIO SIM (MOVILIDAD) (22)

- Composición (g/L):

Peptona de caseína 20.0; peptona de carne 6.6; citrato de amonio hierro (III); tiosulfato de sodio 0.2; agar-agar 3.0.

- Preparación:

Disolver 30g en un litro de agua desmineralizada, dispensar en tubos de ensayo, autoclavar a 121°C por 15 minutos. Dejar solidificar en posición vertical.

AGAR CITRATO SIMMONS

- Composición (g/L):

Fosfato de amonio dihidrogenado 1.0; fosfato dipotásico hidrogenado 1.0; cloruro de sodio 5.0; citrato de sodio 2.0; sulfato de magnesio 0.2; azul de bromotimol 0.08; agar-agar 13.0.

- Preparación

Disolver 22.3g en un litro de agua desmineralizada, autoclavar a 121°C por 15 minutos. Inclinar los tubos y dejar que el medio se solidifique.

AGAR BASE SANGRE

- Composición (g/litro)

Sustrato nutrientes (extracto de corazón y peptonas) 20.0; cloruro de sodio 5.0; agar-agar 15.0.

- Preparación:

Disolver 40g en un litro de agua desmineralizada, autoclavar a 121°C por 15 minutos. Agregar 5-8% de sangre desfibrinada y mezclar.

AGAR MUELLER-HINTON

- Composición (g/litro)

Infusión de carne 2.0; caseína hidrolizada 17.5; almidón 1.5; agar-agar 13.0.

- Preparación:

Disolver 34.0g en un litro de agua desmineralizada, autoclavar a 115°C por 10 minutos, enfriar a 45-50°C y agregar 5-10% de sangre desfibrinada y verter en placas.