

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO A. C.**

Detección y Caracterización Polifásica de Cepas de *Listeria monocytogenes* Aisladas Durante la Cadena de Producción y Comercialización de Queso Fresco

Por:

Rosa Imelda Moreno Enríquez

Tesis aprobada por la

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

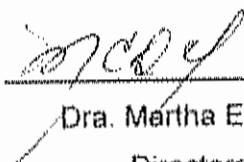
MAESTRIA EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

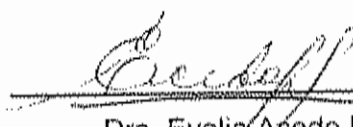
Agosto del 2005

APROBACIÓN

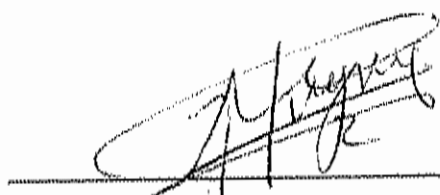
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Rosa Imelda Moreno Enríquez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



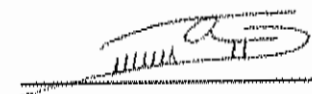
Dra. Mertha Elvia Díaz Cinco
Directora de Tesis



Dra. Evelia Acedo Félix



M. en C. Humberto González Ríos



M. en C. Alfonso García Galaz

DECLARACIÓN DEL AUTOR

Se permiten citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Se podrá solicitar permiso del Director del Centro o Jefe del Departamento de Ciencia de los Alimentos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora, México, C. P. 83000, para citas mas amplias o la reproducción íntegra del documento para fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso del autor.



Dr. Alfonso A. Gardea Béjar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado para la realización de este trabajo.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., por abrirme sus puertas.

A la Dra. Martha Elvia Díaz Cinco, por brindarme su confianza y apoyo para realizar esta parte del proyecto.

A Alfonso García Galaz por su invaluable ayuda en el laboratorio y en la revisión de este trabajo, pero sobre todo por brindarme su amistad incondicional, por su infinita paciencia y por todos los momentos que compartimos. Gracias por todo!!!!

A la Dra. Evelia Acedo Félix y M. en C. Humberto González Ríos por sus consejos para la elaboración de este trabajo y por la revisión y correcciones hechas al mismo.

A Ana Lilita López Duarte de Velarde Rascón, Yolanda Nuñez (o es Nunez??), Susana Lion Market y Rosalvita por su apoyo tanto moral como en el laboratorio, su gran amistad y por hacer mi estancia en micro mucho, pero mucho más amena.

A Claudita, Enrique Bolado, Bethel, Paty, Esmé, Délica, Vicky, Isa y Leo por ser invaluable compañeros y amigos del laboratorio y por cada uno de los momentos que me permitieron compartir con ustedes.

A todos mis amigos y compañeros de la Maestría por lo que vivimos y compartimos en esta etapa que, estoy segura, será inolvidable para cada uno de nosotros.

DEDICATORIA

A Dios por darme fuerza para emprender una nueva aventura en mi vida y por todas las enseñanzas que me deja cada uno de los momentos vividos y por los que me faltan por vivir.

A mi Papi y mi Mami por dejarme volar, permitirme tomar mis decisiones y aprender de lo bueno y lo malo de cada una de ellas. Por estar siempre a mi lado y con su amor ayudarme a no caer, pero sobre todo porque a pesar de los momentos difíciles, estuvimos siempre unidos, porque el amor no lo detiene la distancia sino que lo hace más y más fuerte. Los amo con todo mi corazón.

A los bombonetes por cuidar lo que más quiero en el mundo y por su apoyo todo este tiempo. Gracias hermanito, te quiero muchísimo y a ti cuñis por estar a su lado.

A todos los Vilchis (García, González, Granados, Villalobos y nuevas familias formadas) por estar al pendiente de mí, los adoro, saben que son mi familia y que lo que soy es en gran medida gracias a ustedes. Chabe, Tita, Gus y Toño tenerlos en mi vida es lo mejor que me ha pasado.

A GP por darme fuerza cuando más lo necesité, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, simplemente por existir y por ser lo mejor que me ha sucedido, TAC.

A Ale, Lucy, Catyta, Nancy Flores, Delia y Mary por demostrarme que la amistad no se rompe con la distancia, sino que se fortalece. Gracias chicos son muy importantes en mi vida y lo saben.

A Nancy Huerta, Elsita, Xavierita y Vari, por compartir más que una casa conmigo, por permitirme compartir un cachito de sus vidas y por todo lo que aprendí de cada una de ustedes. Saben que fueron mi familia en Hillo y siempre las llevaré en mi corazón.

A Sara, Abraham, Gio y Mundo por ser tan buenos amigos y apoyarme en todo momento, mil gracias.

A mi Gúerita linda (qpd), te lo prometí y te lo llevo, te amo donde quiera que te encuentres.

GRACIAS

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xi
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
ANTECEDENTES	4
Género <i>Listeria</i>	4
<i>Listeria monocytogenes</i>	4
Listeriosis	7
Métodos de Identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	9
Análisis de Restricción del DNA Ribosomal Amplificado por PCR (ARDRA)	13
Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE).....	14
Queso	16
Queso Fresco.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Muestreo	20
Toma de Muestras	20
Primer Muestreo.....	20
Segundo Muestreo	24
Tercer Muestreo	25
Aislamiento de <i>L. monocytogenes</i> por NOM-143-SSA1-1995 (SSA, 1995).....	27
Enriquecimiento.....	27
Aislamiento.....	27
Identificación	27
Serología.....	30

Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> por la técnica del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2002).....	30
Enriquecimiento primario con caldo UVM	30
Enriquecimiento secundario en FB (Caldo Fraser)	31
Purificación y aislamiento	31
Identificación	31
Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE).....	31
Elaboración de los discos	31
Lisis	32
Digestión de los discos	32
Electroforesis de Campo Pulsado.....	32
Análisis de Restricción del ADNr Amplificado por PCR (ARDRA).....	33
Análisis Estadístico	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
Primer Muestreo.....	34
Segundo Muestreo	50
Tercer Muestreo	53
CONCLUSIONES	62
RECOMENDACIONES	64
REFERENCIAS.....	65
ANEXO. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS.....	73
Caldo de Enriquecimiento (EB)	73
Medio de Cloruro de Litio Feniletanol-Moxolactam (LPM)	74
Medio Oxford (OXA).....	74
Agar Soya Tripticasa con 0,6% de extracto de levadura (ASTEL)	75
Medio de la Universidad de Vermont (UVM).....	76
Medio Fraser	77
Medio Oxford Modificado (MOX)	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características Bioquímicas de las especies de <i>Listeria</i>	5
Tabla 2. Número de muestras tomadas en zona Sur del Estado de Sonora (Huatabampo, Obregón, Navojoa) en Invierno y Verano, para cada uno de los puntos establecidos.....	35
Tabla 3. Número de muestras tomadas en zona Centro del Estado de Sonora (Empalme, Hermosillo) en Invierno y Verano, para cada uno de los puntos establecidos.	36
Tabla 4. Número de muestras tomadas en zona Norte del Estado de Sonora (Agua Prieta, Cananea, Santa Ana, Magdalena) en Invierno y Verano, para cada uno de los puntos establecidos.	37
Tabla 5. Número de muestras tomadas con medio de enriquecimiento para <i>L. monocytogenes</i> , para cada uno de los puntos establecidos.....	51
Tabla 6. Número de muestras tomadas utilizando la técnica de la USDA (USDA, 2002) para la recuperación de cepas de <i>L. monocytogenes</i> , para cada uno de los puntos establecidos.	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Puntos de toma de muestras para aislar <i>L. monocytogenes</i>	21
Figura 2. Amplificación por PCR de ADN de cepas aisladas de muestras problema	39
Figura 3. Porcentaje de muestras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> del total de muestras tomadas por época del año.	41
Figura 4. Porcentaje de muestras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> del total de muestras tomadas por región geográfica.	42
Figura 5. Porcentaje de muestras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> del total de muestras tomadas por puntos de la cadena de producción y comercialización.	43
Figura 6. Perfiles generados por técnica de ARDRA y coeficientes de similitud obtenidos, a través de dendrograma de asociación, para las cepas aisladas en el primer muestreo.	46
Figura 7. Perfiles generados por técnica de PFGE y coeficientes de similitud obtenidos por estrato, a través de dendrograma de asociación PFGE-ARDRA, para cepas aisladas en el primer muestreo.	48
Figura 8. Porcentaje de muestras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> del total de muestras tomadas por puntos de la cadena de producción y comercialización para segundo muestreo.	52
Figura 9. Porcentaje de muestras positivas para <i>Listeria monocytogenes</i> del total de muestras tomadas por puntos de la cadena de producción y comercialización, con técnica de recuperación de la USDA (USDA, 2002)	56
Figura 10 . Perfiles generados por técnica de ARDRA para cepas aisladas en el segundo y tercer Muestreo.	58
Figura 11. Perfiles generados por técnica de PFGE y coeficientes de similitud obtenidos, a través de dendrograma de asociación, para cepas aisladas en el segundo y tercer muestreo.	59

RESUMEN

Listeria monocytogenes es una bacteria que causa meningitis, septicemia y abortos. Tiene una tasa de mortalidad muy alta, además de sobrevivir a diversas condiciones ambientales, encontrándose en agua, suelo, animales y alimentos. Los brotes de listeriosis, a nivel mundial, tienen como principal vehículo acarreador a los alimentos como productos lácteos y cárnicos. En México no se conoce la incidencia de la enfermedad, pero se ha determinado la presencia de la bacteria en Queso Fresco Regional Sonorense. Este producto se elabora de manera artesanal con leche no pasteurizada y estas condiciones, aunadas a la ubicuidad del microorganismo, provocan que la contaminación del queso se produzca en diversos puntos de la cadena de producción o bien durante la comercialización. Para identificar el punto de contaminación, se aislaron cepas de *Listeria monocytogenes* y se caracterizaron fenotípica (NOM-143-SSA1-1995 y USDA) y genotípicamente (PFGE y ARDRA). El estudio se dividió en tres muestreos, en el primero, se determinó la zona y época del año con mayor incidencia de la bacteria en Centro, Norte y Sur del Estado de Sonora, tanto en Invierno como Verano, considerando tres estratos de producción: establo, lugar de elaboración y comercialización. Se tomaron 381 muestras, transportadas en un medio de cultivo general, de las cuales 7 muestras de queso fueron positivas para *Listeria monocytogenes*, aislándose 17 cepas. Al considerar los estratos se encontró que en la zona Norte del Estado durante Invierno, hubo un mayor aislamiento de cepas. A nivel molecular se observaron tendencias de agrupamiento por época, pero no por región y se observó gran diversidad genómica en las cepas presentes en los quesos. En el segundo muestreo, se tomaron 39 muestras en el Norte del Estado durante el Invierno, se transportaron en medio selectivo para *Listeria* spp. y se identificaron por la técnica descrita en la NOM. Se aislaron 16 cepas de 4 muestras positivas, correspondientes a superficies del lugar de procesamiento y 1 muestra de queso. Se realizó un tercer muestreo en el mismo lugar, empleando para el aislamiento, la técnica de la USDA. Se tomaron 25 muestras, de las cuales hubo 5 positivas, correspondientes a superficies del lugar de procesamiento, lo cual indica que el lugar de elaboración es el punto probable de contaminación. Se aislaron 12 cepas que se caracterizaron molecularmente junto a las 16 anteriores y se encontró que por ARDRA todas produjeron el mismo perfil y por PFGE hubo 27 perfiles diferentes de 28 cepas, por lo tanto existe, una gran variabilidad genómica de *Listeria monocytogenes* tanto en el sitio de elaboración como en el producto final.

produjeron el 111is1110 peliil y por PFGE hubo 27 perfiles diferentes ,Je 28 cepas, por lo tanto existe, una gran variabilidad genética de UslrHio 111onoc;jr/09r,nes tanto el el sitio de elaboración 01110 en el producto final

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un microorganismo ubicuo, resistente a diversas condiciones ambientales, puede encontrarse en suelo, plantas, agua y una gran cantidad de alimentos, así como en heces de humanos y animales. Esta bacteria puede encontrarse en las plantas procesadoras de alimentos y la entrada a éstas ocurre a través de tierra sobre los zapatos y ropa de los trabajadores, sobre el equipo de transporte, superficies contaminadas y posiblemente por portadores humanos (Rocourt y Cossart, 1997; Iñiguez, 2002).

Esta bacteria es de interés en salud pública ya que causa listeriosis, una infección que provoca meningitis, septicemia, abortos y tiene una tasa de mortalidad que va del 20 al 40%, además del desarrollo de secuelas, como retardo psicomotor, en las personas infectadas (Bahk y Marth, 1990; Iñiguez, 2002; McLauchlin *et al.*, 2004). Para el desarrollo de la enfermedad se requieren niveles de contaminación de 10^2 a 10^4 células de *L. monocytogenes* por gramo de alimento. Sin embargo, la dosis de infección varía dependiendo de la patogenicidad y virulencia de la cepa involucrada y de los factores de riesgo del hospedero (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

De las 13 serovariedades que pueden causar la enfermedad, el 95% pertenecen a 1/2a, 1/2b y 4b, siendo esta última la responsable del 33-50% de los casos esporádicos mundiales de listeriosis humana. Esta serovariedad es también responsable de los principales brotes producidos por alimentos desde 1981 (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

La identificación de *Listeria monocytogenes* se basa en sus características fenotípicas y genotípicas. En algunos trabajos como los de Jacquet *et al.* (1995) y Boerlin *et al.* (1996, 1997), se caracterizaron cepas de *L. monocytogenes* por serotipificación, ribotipado, y electroforesis de campo pulsado, dichas cepas estaban fenotípica y genotípicamente muy relacionadas con las responsables de brotes de listeriosis en Europa y Norteamérica.

Entre los alimentos más estudiados para detectar *Listeria monocytogenes*, se encuentran la leche y los productos lácteos ya que éstos han sido los responsables de varios brotes de listeriosis detectados a nivel mundial además de que el queso fresco se ha asociado a varios brotes y casos esporádicos de la enfermedad en Estados Unidos. La elaboración de queso fresco a partir de leche cruda se realiza de manera artesanal, por lo que es un riesgo para la salud por el alto grado de contaminación microbiana.

En el estado de Sonora, la elaboración del queso fresco está sujeta a un control de calidad empírico, basado en características sensoriales. La prevalencia de esta bacteria en dicho alimento fue del 4% en el año 2000 (García *et al.*, 2000), incrementándose a 9.9% en el 2001 (Iñiguez, 2002). Sin embargo, no se conoce el punto donde se está llevando a cabo la contaminación del producto. Por ello y por el riesgo que implican posibles brotes de listeriosis, es importante el aislamiento de cepas provenientes de diferentes puntos de la cadena de producción de queso fresco, en el estado de Sonora, así como su caracterización por técnicas moleculares para que pueda determinarse (mediante similitud entre cepas) el origen de la contaminación.

OBJETIVO GENERAL

Detectar y caracterizar polifásicamente cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de diversos puntos de la cadena de producción y comercialización de queso fresco, adquirido en el Estado de Sonora.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar muestreos en diferentes puntos de la cadena de producción y comercialización de queso fresco en el Norte, Centro y Sur del Estado de Sonora en dos épocas del año.
- Aislar e identificar cepas de *Listeria monocytogenes* mediante la NOM-143-SSA1-1995 para determinar zona y época de mayor contaminación.
- Determinar el mejor método de recuperación de cepas de *Listeria monocytogenes* en la zona y época de mayor contaminación.
- Caracterizar las cepas aisladas, mediante Electroforesis de Campo Pulsado y Análisis de Restricción del DNA Ribosomal Amplificado por PCR.

ANTECEDENTES

Género *Listeria*

El género *Listeria* es un grupo de bacterias Gram positivas con un contenido de Guanina y Citosina de 36--42% en su DNA (Rocourt y Cossart, 1997). Son bacilos anaerobios facultativos de 0.4 x 1.0 a 1.5 μm , no forman esporas, no tienen cápsula y tienden a producir cadenas de 3 a 5 células. Son móviles a temperaturas de 10 a 25° C, pero no tienen movilidad a 37° C (Vázquez-Boland *et al.*, 2001, Carpenter, 1977).

El género *Listeria* contiene seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*, cuyas características bioquímicas pueden observarse en la Tabla 1. Estas especies pueden subdividirse en 16 serotipos bajo el esquema Seelinger/Donker-Voet, definidos por 15 antígenos O y 5 antígenos H (Axelsson, 1998). Sólo las especies hemolíticas (*L. ivanovii*, *L. monocytogenes* y *L. seeligeri*) se asocian con patogenicidad en humanos, son raros los casos de listeriosis provocados por *L. ivanovii* y sólo se ha reportado un caso en Suiza, provocado por *L. seeligeri* (Cocolin *et al.*, 2002, Rocourt y Cossart, 1997; Bahk y Marth, 1990). Se reportó un caso poco común de bacteremia provocada por *L. innocua* y no existen datos sobre infecciones provocadas por *L. welshimeri* y *L. grayi* (Perrin *et al.*, 2003; McLauchlin *et al.*, 2004).

Listeria monocytogenes

Murray en 1926 fue quien aisló por primera vez *L. monocytogenes* en cobayos y esta bacteria fue reconocida como patógeno humano cerca de 70 años después (Mereghetti, *et al.*, 2002). Es un bacilo pequeño que puede presentarse en pares y confundirse con cocos. No forma cápsula y es Gram positivo, aunque las colonias viejas pueden presentar células Gram negativas. A pesar de no formar esporas puede sobrevivir por largos períodos en diferentes condiciones ambientales (Bahk y Marth, 1990; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

Tabla 1. Características Bioquímicas de las especies de *Listeria*.

(NOM-143-SSA1-1995; SSA, 1995)

Especie	β-Hemólisis	Reducción Nitratos	D	M	E	Ma	R	X	CAMP		Serotipo
									S. a	R. e	
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	5
<i>L. innocua</i>	-	-	+	+	+	-	V	-	-	-	4ab, 6a, 6b
<i>L. welshimeri</i>	-	-	+	+	+	-	V	+	-	-	6a, 6b
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	1/2b, 4c, 4d, 6b
<i>L. grayi</i>	-	V	+	+	+	V	V	-	-	-	

V = Variable

D = Dextrosa

M = Maltosa

E = Esculina

Ma = Manitol

R = Ramnosa

X = Xilosa

S. a = *Staphylococcus aureus*, R. e = *Rhodococcus equi*

¹ = Puede haber reacciones débilmente positivas, particularmente a las 48 h de incubación

Entre las características bioquímicas de este microorganismo se destaca que es aerobio, móvil a 25° C y β -hemolítico. Sin embargo, se han descrito recientemente cepas no hemolíticas (Rocourt y Cossart, 1997; Perrin *et al.*, 2003). Es catalasa positivo, oxidasa negativo e hidroliza la esculina. Crece mejor en medio neutro o ligeramente alcalino, pero puede crecer a valores de pH menores de 5.0 y sobrevivir por semanas o meses en esas condiciones. Es halotolerante y psicotrófico aunque el mejor crecimiento es entre 30 y 37° C (Bahk y Marth, 1990; Farber y Peterkin, 1991).

L. monocytogenes se encuentra normalmente en el ambiente, se cree que tiene una vida saprofita en una asociación muy cercana con el suelo. Ha sido aislado de diferentes fuentes ambientales como vegetación, efluentes y de alimentos crudos y procesados (Rocourt y Cossart, 1997). Sin embargo, los productos lácteos son los más susceptibles a contaminación (Brackett, 1988). Este microorganismo se encuentra en una amplia variedad de hospederos, animales domésticos o de granja, peces, insectos, mascotas y aves. Un porcentaje alto de animales son portadores y al parecer es un residente en la flora normal del ser humano, cerca del 5 al 10% de la población se considera portadora (Farber y Peterkin, 1991).

Existen 13 serovariedades que pueden causar enfermedad, pero el 95% de las cepas aisladas de humanos pertenecen a 3 serovariedades, de las cuales, la 4b es responsable de 33-50% de los casos esporádicos mundiales de listeriosis humana y de los brotes producidos por alimentos. Se han realizado estudios en ratones respecto a la patogenicidad de varias cepas de *Listeria monocytogenes*, y éstos indican que existe heterogeneidad en los niveles de virulencia, ya que algunas cepas mostraron alta virulencia, algunas baja y rara vez no existió virulencia. Sin embargo, todas las cepas de la especie se consideran potencialmente patógenas para humanos (Rocourt y Cossart, 1997).

Listeriosis

Listeriosis es la infección producida por *Listeria monocytogenes* y se estima que causa 2500 casos de enfermedad grave y 500 muertes por año en Estados Unidos (Czuprynski *et al.*, 2002). El primer informe confirmado de infección por *Listeria monocytogenes* en humanos apareció en 1929, la bacteria fue aislada de 3 pacientes con una enfermedad tipo mononucleosis (Bahk y Marth, 1990).

Algunas condiciones que predisponen la infección son: enfermedad neoplásica, inmunosupresión, embarazo, vejez, diabetes mellitus, alcoholismo y enfermedades cardiovasculares (Farber y Peterkin, 1991). Los síntomas clínicos de infección por *L. monocytogenes* son muy similares en todos los hospederos susceptibles. La tasa de mortalidad en humanos es de 20 a 40% y hay dos formas básicas que pueden distinguirse: listeriosis perinatal y listeriosis en pacientes adultos (Mc Lauchlin *et al.*, 2004; Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

La listeriosis fetomaternal y neonatal se produce principalmente por la invasión bacteriana del feto, vía placenta. Su consecuencia es aborto, generalmente de los cinco meses de gestación en adelante, o el nacimiento de un bebé o feto muerto, con infección generalizada. La infección en la madre es asintomática o puede caracterizarse por enfermedad como gripe con fiebre, fatiga, dolor de cabeza, dolor muscular y escalofrío de 2 a 14 días antes del aborto. De manera menos frecuente se observa la listeriosis neonatal tardía, que ocurre de 1 a 8 semanas posteriores al parto e involucra síndrome febril, acompañado por meningitis y en algunos casos gastroenteritis y neumonía. La mortalidad de ésta es de 10 – 20%, pero puede tener secuelas como hidrocefalia y retardo psicomotor (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Hay mujeres embarazadas que pueden ser portadoras de *L. monocytogenes* y dar a luz a niños saludables. También se ha tratado la infección con antibióticos en mujeres portadoras y el embarazo se ha llevado a cabo con buen término (Farber y Peterkin, 1991).

La infección en pacientes adultos distintos de embarazadas, afecta el sistema nervioso central (55-70% de los casos). Ésta se desarrolla normalmente como una meningoencefalitis acompañada por cambios severos en la conciencia, desórdenes de

movimiento y en algunos casos parálisis de los nervios craneales. La tasa de mortalidad es de aproximadamente un 20% (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). La bacteremia o septicemia (15 a 50% de los casos), tiene una elevada tasa de mortalidad (más del 70%), si se asocia a condiciones de susceptibilidad del hospedero como inmunosupresión o debilidad. Existen otras formas clínicas atípicas de la infección que se presentan en el 5–10% de los casos como: Endocarditis, miocarditis, arteritis, neumonía, pleuritis, hepatitis, peritonitis, artritis, sinusitis, otitis y en vacas, mastitis.

La incidencia de listeriosis humana es de 2 a 8 casos esporádicos anuales por un millón de habitantes en Europa y Estados Unidos. No se conoce la dosis mínima requerida para causar infección clínica en humanos, sin embargo el número de bacterias de *L. monocytogenes* detectadas en alimentos responsables de casos esporádicos de listeriosis sugiere que es de más de 100 UFC/g (Bahk y Marth, 1990; Rocourt y Cossart, 1997).

Los brotes de listeriosis se han relacionado al consumo de productos lácteos como queso, leche con chocolate, mantequilla y productos cárnicos (Waak *et al.*, 2002). Los productos lácteos que han estado implicados en la mitad de los brotes de listeriosis en Europa (Lunden *et al.*, 2004) han sido por el consumo de leche cruda o no pasteurizada adecuadamente. El factor más frecuente de brotes en Estados Unidos y Canadá, relacionados al queso, es la contaminación post-pasteurización (Johnson *et al.*, 1990).

El primer brote de listeriosis documentado en Europa se cree que fue debido a leche contaminada durante el periodo posterior a la Segunda Guerra Mundial, cuando la leche estaba racionada y se vendía en el mercado negro. Un enorme brote en Italia, en 1997 involucró más de 1700 individuos y hubo 292 personas hospitalizadas (Waak *et al.*, 2002). En Inglaterra y Francia entre 1988 y 1993, se presentaron brotes asociados al consumo de productos cárnicos (Czuprynski *et al.*, 2002).

El primer brote documentado en Estados Unidos fue en 1981, con 41 casos y una tasa de mortalidad de 30%, el vehículo probable fue ensalada de col cosechada en

campos fertilizados con estiércol de ovejas con listeriosis. El segundo brote ocurrió en Massachussets, en 1983 con 49 casos confirmados y al menos cuatro muertes, el vehículo fue queso estilo mexicano (Ryser *et al.*, 1996). En 1985, el mismo tipo de queso provocó la infección de 142 personas y 47 muertes (Bolton y Frank, 1999). En 1998 y 1999 hubo un brote como resultado de la ingestión de salchichas contaminadas con el serotipo 4b que poseía un perfil molecular no convencional para *L. monocytogenes*, determinado por ribotipado. El 13 de noviembre de 2000 se informó de 3 casos de listeriosis en inmigrantes mexicanos de Carolina del Norte, teniendo como agente causal el queso fresco estilo mexicano. Otros tres se reportaron en Texas en 2003, también relacionados con queso fresco estilo mexicano (Czuprynski *et al.*, 2002; CDC, 2001; Bordoni, 2004). El último brote reportado fue el del año 2002 en 8 estados del noreste de este país, con 46 casos confirmados, 7 muertes y 3 abortos, debido al consumo de jamón de pavo (CDC, 2002).

En México en 1981 sólo se conocían 16 casos de listeriosis, 12 con meningoencefalitis y 4 con septicemia. Hasta 1987, se sabía de 36 casos, sin embargo la verdadera incidencia de listeriosis en el país se desconoce. A pesar de que en áreas rurales es común el consumo de productos lácteos, elaborados con leche cruda, no hay registro de brotes que se hayan suscitado por el consumo de estos alimentos (Iñiguez, 2002). De acuerdo a la Secretaría de Salud, en el reporte de incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos 1996-2000, "*Listeria monocytogenes* no ha sido identificada por el sistema de vigilancia sanitaria de la comisión federal para protección contra riesgos sanitarios" (Flores, 2002). Sin embargo en investigaciones realizadas en los años 2000 y 2002 en el Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, utilizando métodos tradicionales, inmunológicos y moleculares, indican la presencia de esta bacteria en queso fresco regional Sonorense (García, 2000; Iñiguez, 2002).

Métodos de identificación de *Listeria monocytogenes*

La caracterización de poblaciones bacterianas con base en sus características fenotípicas o genotípicas, es llamada subtipificación o tipificación. Un tipo genético

homogéneo entre varias cepas, indica una posible fuente en común, además de ser útil para establecer la asociación de cierto grupo microbiano con rasgos distintivos de virulencia o patogenicidad. Las características ideales de un método de tipificación incluyen alto poder discriminante, alta reproducibilidad y la posibilidad de automatización (Wagner y Allerberger, 2003).

El crecimiento de un microorganismo permite la evaluación de sus características morfológicas, bioquímicas y metabólicas. Un patrón particular de estas actividades pueden definir una especie o grupo específico de manera individual. El crecimiento provee además grandes cantidades de material celular para la detección inmunológica de antígenos específicos y pruebas bioquímicas, estas características macroscópicas son conocidas como fenotipos (Relman y Persing, 1996).

La caracterización fenotípica juega un papel clave en la microbiología clínica, pero la identificación basada en características como requerimientos de factores de crecimiento y ensayos de actividad metabólica, tinción Gram, morfología y apariencia colonial, pueden ser subjetivos además de que un fenotipo sencillo se puede generar por un número variable de genes o combinaciones de éstos. La identificación genotípica se basa en el análisis de material genético cromosómico o extracromosómico, presente dentro de un microorganismo y ofrece ventajas sobre los métodos tradicionales. Entre las ventajas se encuentran su habilidad para discriminar entre cepas, todas las cepas son tipificables puesto que su ADN puede ser extraído y las técnicas pueden aplicarse a ADN de cualquier fuente, además que éste es estable y sus características son independientes de las condiciones del cultivo. Entre las desventajas están que algunas técnicas son muy costosas o involucran dificultad técnica (Bottger, 1996; Farber, 1996; Olive y Bean, 1999).

La aparición de síntomas clínicos de listeriosis, después de la ingestión de alimentos contaminados, puede tomar unos días o varias semanas, este factor hace necesaria la utilización de métodos sensibles para identificar la fuente y seguir la ruta de contaminación del alimento (Czajka y Batt, 1994).

De manera general, se han desarrollado tres métodos para aislar y detectar *L. monocytogenes*: 1) Aislamiento directo en placa con medios selectivos, que tiene la ventaja de cuantificar poblaciones del microorganismo directamente del alimento, aunque tiene la desventaja de ser poco sensible, ya que sólo detecta poblaciones mayores de 100 UFC/g. 2) Enriquecimiento seguido de aislamiento en medio selectivo, se utiliza para recuperar células dañadas e implica uno o dos pasos de enriquecimiento para posteriormente pasar a medios selectivos. 3) Enriquecimiento seguido de un método rápido de detección (Axelsson, 1998).

En México la detección de *L. monocytogenes* se realiza utilizando la técnica descrita en la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995 (SSA, 1995). Esta se basa en un preenriquecimiento selectivo de la muestra para incrementar la población de microorganismos, seguido de un aislamiento de las colonias en medios de cultivo selectivos y diferenciales (Iñiguez, 2002). Esta técnica indica también el uso de piruvato en caso de que se sospeche la presencia de células dañadas, sin embargo para una mejor recuperación de éstas células se emplean técnicas como las de la USDA (Departamento de Agricultura de Estados Unidos, por sus siglas en Inglés) que implica tres etapas: 1) Preenriquecimiento en medio semi-selectivo, que permite recuperar células dañadas, 2) Enriquecimiento selectivo, que permite el crecimiento de *Listeria* mientras disminuye la microflora competitiva y 3) Aislamiento en medios selectivos (Axelsson, 1998).

Los métodos de subtipificación utilizados para cepas de *L. monocytogenes*, incluyen las técnicas de serotipificación, tipificación por fagos y análisis de isoenzimas. La serotipificación no distingue cepas patógenas de las que no lo son, ni identifica especies dentro del género. La tipificación por fagos distingue del 60-70% de aislados, pero las cepas del serotipo 1/2a no pueden ser tipificadas por este método. También se incluyen métodos que se basan en caracterización de ADN como son la Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE), ribotipado y métodos basados en Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Baxter *et al.*, 1993; McLauchlin *et al.*, 2004).

Se han empleado diversos métodos de tipificación como ribotipado, ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD), Electroforesis de Campo Pulsado y Fragmentos Amplificados de Longitud Polimórfica (AFLP), para dividir las especies de *L. monocytogenes* en dos grupos. Uno de ellos contiene serotipos 1/2b, 4b y 3b y el otro grupo los serotipos 1/2a, 1/2c y 3a, sin embargo la estructura genética de cada grupo se ha determinado sólo parcialmente (Mereghetti *et al.*, 2002).

Entre los métodos rápidos para identificar a *L. monocytogenes* se encuentra la reacción en cadena de la polimerasa, que es un proceso de amplificación *in vitro* que involucra tres pasos. 1) La doble cadena primero es desnaturalizada a una temperatura elevada, para formar cadenas sencillas de ácidos nucleicos. 2) Dos cadenas cortas de oligonucleótidos (iniciadores) hibridan o reconocen fragmentos en las cadenas sencillas. 3) la extensión enzimática es catalizada por una polimerasa que adiciona nucleótidos. La nueva cadena de ADN que se forma puede servir como molde para que se inicie un nuevo ciclo de formación de fragmentos y la extensión se repita de manera exponencial (Harris y Griffiths, 1992).

La secuencia de los iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado, entre los genes utilizados para amplificar el ADN de *L. monocytogenes* por PCR se encuentran los de *inlA*, *inlB* e *iap*, que codifican proteínas implicadas en la capacidad de la bacteria para invadir la célula. Otro gen empleado es el *hlyA* que codifica la producción de listeriolisina O, una proteína asociada a la supervivencia del patógeno dentro de la célula huésped, responsable de la β -hemólisis en agar sangre y de la destrucción de las células fagocitarias que engloban a la bacteria. Es una región muy conservada en el genoma de *L. monocytogenes* y diversos estudios demuestran que este gen no se expresa en otras cepas hemolíticas como *L. ivanovi* y *L. seeligeri* (Harris y Griffiths, 1992; Unnerstad *et al.*, 1999; Cocolin *et al.*, 2002; Rodríguez-Lázaro *et al.*, 2004).

Un gran número de estudios demuestran que *L. monocytogenes* se encuentra en plantas procesadoras de alimentos, incluyendo plantas de productos de aves de corral (Lawrence y Gilmour, 1995), plantas procesadoras de carne como lo describe

Fonnesbech *et al.* (2001), plantas de lácteos (Waak *et al.*, 2002) y de productos pesqueros (Miettinen *et al.*, 1999). Mientras que algunos estudios autores mencionan que los productos crudos son la principal fuente de contaminación (Fonnesbech *et al.*, 2001), otros reportan que es el ambiente de procesamiento y el equipo (Autio, *et al.*, 1999). Por estas razones es muy importante el empleo de técnicas de tipificación con alto poder discriminante como Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE) o técnicas basadas en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Fonnesbech *et al.*, 2001).

Análisis de Restricción del DNA Ribosomal Amplificado por PCR (ARDRA)

Entre las técnicas de tipificación de microorganismos, basadas en PCR, se encuentra la amplificación de fragmentos polimórficos al azar (RFLP). En este método, primero se realiza una PCR para amplificar una región de interés, utilizando iniciadores conocidos. Cuando se emplean como blanco para amplificación las regiones 16S, 23S y regiones del espacio 16S-23S, la técnica se conoce como Análisis de Restricción del DNA Ribosomal (ARDRA) o RFLP-rDNA. El amplicón es entonces digerido con una endonucleasa de restricción de manera tal que se obtiene un perfil electroforético al correr un gel de agarosa y tefirlo con bromuro de etidio (Struelens, 1998).

Es una técnica rápida, simple y reproducible, que ha resultado muy útil, para discriminar microorganismos a nivel de especies dentro de algunos géneros como *Bifidobacterium*, *Acinetobacter*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Leptospira*, *Streptococcus*, *Mycobacterium* y *Mycoplasma*, debido a su rapidez y confiabilidad (Vanechoute *et al.*, 1998, Olive y Bean, 1999, De Baere *et al.*, 2002, Schlegel *et al.*, 2003, Shuhaimi *et al.*, 2004). El poder discriminante no es tan bueno como en otros métodos, debido principalmente a la limitada región del genoma que puede ser examinada y a las enzimas de restricción empleadas (Farber, 1996, Struelens, 1998).

Vanechoute *et al.* (1998) compararon cuatro técnicas basadas en PCR para identificar a nivel de especies aislados de *Listeria* y encontraron que, de las técnicas estudiadas, ARDRA fue la que generó mejores resultados por su poder discriminante y

aplicabilidad práctica, por ello ha sido exitosamente utilizada para análisis de comunidades bacterianas en una gran variedad de ambientes, incluyendo alimentos (Lagacé, *et al.*, 2004).

Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

El análisis de macrorestricción, visualizado por medio de electroforesis de campo pulsado (PFGE), ha emergido como el estándar de oro para caracterizar microorganismos patógenos, mediante sus perfiles electroforéticos. Una ventaja de esta técnica es que las enzimas de restricción que se utilizan son de corte poco frecuente y produce perfiles de entre 10 y 20 bandas, de manera que el análisis por computadora es sencillo, rápido y permite una comparación eficiente entre cepas (Graves y Swaminathan, 2001; Struelens, 1998).

El cambio periódico en la orientación del campo eléctrico durante la electroforesis, permite la separación y determinación del tamaño de los fragmentos de macrorestricción, ya que con cada ciclo hay una reorientación de los fragmentos con respecto al campo (Chu, 1990; Struelens, 1998). Los equipos de campo pulsado que existen son: FIGE (Field-Inversion Gel Electrophoresis), que invierte el campo periódicamente por 180°; RGE (Rotating Gel Electrophoresis), rota mecánicamente sobre una plataforma móvil que está colocada entre dos electrodos paralelos; TAFE (Transverse Alternating Field Electrophoresis), usa cuatro electrodos que son colocados paralelos a las caras del gel, el cual es balanceado verticalmente en el tanque de amortiguador (Chu, 1990).

El equipo más utilizado es el CHEF (Contour-Campled Homogeneous Electric Field), el cual emplea un arreglo geométrico de electrodos para producir un campo eléctrico que es reorientado electrónicamente. El arreglo de electrodos múltiples alrededor de un sistema cerrado, genera potenciales apropiados para un campo uniforme. Con este equipo el grado de uniformidad y el número de electrodos se incrementa, por lo que el gel puede estar libre de cualquier distorsión (Chu, 1990).

Para realizar la técnica de PFGE, los aislados bacterianos se dejan crecer en un medio de cultivo, que puede ser sólido o líquido, y son homogenizados con agarosa fundida, produciendo discos de agarosa, que contiene la bacteria completa. Esta bacteria embebida es entonces sujeta a una lisis *in situ* y se producen esferoplastos por digestión con lisozima. Los discos son incubados con altas concentraciones de EDTA para inhibir nucleasas, junto con un detergente, el lauril sarcosinato y proteinasa K para eliminar proteínas unidas al ADN. Finalmente, los discos se someten a digestión con enzimas de restricción. Los discos de bacterias digeridas son colocados en un gel de agarosa y se someten a electroforesis, los patrones electroforéticos pueden ser visualizados con bromuro de etidio y los datos analizados con paquetes de software comerciales de Applied Math, Bio-Rad, BioSystematics, NTSyS, Media Cybernetics o Scanalytics (Chu, 1990; Olive y Bean, 1999).

Entre las ventajas que presenta esta técnica se puede mencionar que el ADN se conserva íntegro dentro del disco de agarosa y los pasos de extracción, centrifugación y precipitación (que involucran manipulación) no son necesarios, además que los patrones generados son estables y reproducibles. Entre las desventajas que puede presentar es que se requiere de varios días para obtener resultados, además de equipo especializado caro, sin embargo Graves y Swaminathan en 2001, generaron un protocolo para obtener resultados por PFGE en 30 horas (Chu, 1990; Struelens, 1998; CDC, 2004).

La electroforesis en gel de campo pulsado, es una técnica molecular que ha sido utilizada para la caracterización epidemiológica de aislados clínicos de *L. monocytogenes* en humanos, y cepas aisladas de alimentos involucrados en casos esporádicos y brotes de listeriosis humana (Vela *et al.*, 2001). En un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud (WHO), se validó el perfil electroforético mediante PFGE como un método altamente discriminante y reproducible para la subtipificación de *L. monocytogenes* (Harvey y Gilmour, 2001). Además es una técnica muy utilizada para elucidar rutas de contaminación en diversas plantas alimenticias, como los trabajos de Autio *et al.* (1999) y Gudmundsdottir *et al.* (2005), en industrias de

pescado ahumado o el de Pourshaban *et al.* (2000), en una industria de salsas listas para consumirse.

Queso

De acuerdo a la FAO/WHO se puede definir al queso como "el producto blando, semiduro, duro y extraduro, madurado o no madurado [...] obtenido mediante coagulación total o parcial de [...] leche y/o productos obtenidos de la leche por efecto del cuajo u otros coagulantes idóneos, y por escurrimiento parcial el suero que se desprende como consecuencia de dicha coagulación [...]" Este producto tiene alto valor nutritivo, es rico en proteínas y calcio. Los quesos frescos tienen un contenido de grasa mayor de 12%, 12% de proteína, 0.7% de calcio y 1.5% de fósforo (Renner, 1987; FAO/WHO, 2003).

Los pasos básicos para la elaboración de la mayoría de los quesos son acidificación, coagulación, deshidratación (cualquier operación que promueva la separación del suero del gel), moldeado y salado (Fox, 1987). El paso esencial de la manufactura del queso involucra la coagulación de la caseína de la leche para formar un gel en el cual queda atrapada la grasa. En la mayoría de los quesos se produce por coagulación enzimática (renina), también se puede dar por la adición de ácidos o mezcla de ambos. La cuajada resultante representa de un 10 al 30% del volumen original de la leche (Walstra *et al.*, 1999).

La manufactura del queso inicia con la selección de leche con una calidad microbiológica y química adecuada. La leche cruda es aún utilizada, sin embargo la mayoría de las veces la leche se pasteuriza. Este proceso altera la microflora contaminante del queso y facilita la manufactura de un producto de calidad uniforme (Fox, 1987).

El crecimiento de diversos microorganismos en el queso o en la superficie puede causar defectos en textura y sabor. El crecimiento está determinado por factores como:

1. Composición microbiana de la leche (condiciones higiénicas durante la ordeña, recontaminación, pasteurización).
2. Medidas para inhibir contaminación durante la manufactura (limpieza del equipo).
3. Adición de inhibidores a la leche para incrementar la fermentación de lactosa y limitar el crecimiento microbiano.
4. Propiedades fisicoquímicas del queso (pH, NaCl, proteína, grasa, a_w) (Walstra *et al.*, 1999).

Queso Fresco

El queso fresco es un producto que se puede consumir inmediatamente después de elaborado, generalmente tiene una vida de anaquel muy limitada. Existen numerosas variedades de queso fresco y varían dependiendo del tipo de leche, contenido de grasa y métodos de elaboración (Walstra *et al.*, 1999). Sin embargo, de manera general es blanco, blando, con alto contenido de humedad, tiene un sabor tenue a leche y es salado. Este producto es popular en América Latina y México, donde se estima que hasta 1987 el consumo era de 5 kg per cápita anuales. Su elaboración se realiza con leche entera de vaca: descremada, semi-descremada o mezcla de leches. El uso de leche cruda causa alta variabilidad en la calidad del producto final, lo cual se atribuye a la diversidad de microflora existente en la leche, la cual se contamina por microorganismos presentes en el ambiente de la ordeña, ya sea en los animales, utensilios, o trabajadores (Torres, 2002).

En una encuesta realizada por la Asociación de Editores de los Estados, se encontró que el 92.6% de la gente en Hermosillo, consume queso y el 44.4% lo hace diariamente (Gallardo, 2004). Respecto a queso fresco, en Sonora el consumo *per cápita* es de 4.6 kg anuales y ocupa el 16º lugar en alimentos más consumidos (Iñiguez, 2002; Valencia *et al.*, 1998). El proceso de elaboración del queso fresco regional, generalmente se rige por técnicas artesanales, la leche no se pasteuriza y se mantiene a temperatura ambiente desde el lugar de ordeña hasta el sitio donde se elabora el

queso. Cuando la leche sale de la ubre de una vaca sana, contiene pocas bacterias y generalmente éstas no se multiplican si se manipula bajo condiciones higiénicas y se mantiene a bajas temperaturas. Durante la ordeña la leche está expuesta a contaminación por los microorganismos propios del animal, sobre todo los presentes en la ubre y zonas cercanas a la misma (Torres-Llanez, 2005).

Probablemente las principales fuentes de contaminación de la leche son los utensilios que se emplean en la ordeña y las superficies que tienen contacto con ella, como los cubos o las máquinas. Otras posibles fuentes son las manos del ordeñador, el aire, el agua y las moscas. El ambiente de la granja puede provocar contaminación por heces, pelo de los animales, moscas y aves. El ensilaje es también fuente potencial de microorganismos, especialmente de los formadores de esporas y de *L. monocytogenes* (Torres-Llanez, 2005). Durante su transporte y almacenamiento, la leche también puede contaminarse (Bemrah *et al.*, 1998).

Para elaborar el queso fresco la leche se coagula con renina en forma directa, ésta puede ser un vehículo de contaminación (Johnson *et al.*, 1990). La leche con renina se agita manualmente y se deja reposar por 2 horas, para posteriormente cortar la cuajada y después de 15 minutos decantar el suero. El resto se separa por filtración en una manta, ejerciendo presión suave para evitar la pérdida de cuajada. Ésta se muele, se sala y se moldea empleando una piedra como prensa, donde permanece de 2 a 3 horas. El producto final no se somete a ningún proceso de maduración y queda listo para su distribución y consumo. El control de calidad que realizan los productores se basa en características sensoriales (Iñiguez, 2002).

En la etapa de elaboración el queso fresco se ve expuesto a contaminación, dada por los recipientes utilizados, el personal, el agua empleada, así como el ambiente de la quesería. Otro factor importante en la contaminación es la distribución. Existen personas que regularmente venden el queso de puerta en puerta (CDC, 2001), esto implica que no se transporta en condiciones adecuadas, lo cual puede incrementar su flora microbiana.

En el municipio de Hermosillo Díaz-Cinco *et al.* (1998) realizaron pruebas de calidad microbiológica con queso Chihuahua y queso fresco y en ambos se encontraron índices de contaminación mayores de los permitidos por la Ley General de Salud. El queso fresco se encontró contaminado con *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus durans*, *S. epidermidis*, *Shigella spp.*, *Arizona spp.* y *Enterobacter spp.* Para *Listeria monocytogenes*, a nivel estatal, la incidencia en el año 2000 era del 4%, incrementándose a 9.9% en el 2001 (García *et al.*, 2000, Iñiguez, 2002).

En un estudio realizado por Iñiguez (2002), se encontró que el queso fresco elaborado en el estado de Sonora presentaba contaminación por *L. monocytogenes* en Norte, Centro y Sur del Estado. En este trabajo no se determinó en qué punto de la cadena de producción se contamina el queso y puesto que *L. monocytogenes* es un microorganismo ubicuo, existen varios puntos en los que puede darse la contaminación. De ahí la importancia de determinar en qué punto de la cadena de producción del queso, éste se contamina con *L. monocytogenes* y de esta manera implementar buenas prácticas de manufactura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

El estudio fue dividido en tres etapas, en la primera se tomaron muestras en diferentes puntos del Estado de Sonora, en dos épocas del año, con la finalidad de encontrar la región y época de mayor contaminación. El muestreo realizado fue estratificado múltiple, considerando los siguientes estratos:

Estrato 1. Época del año: Invierno y Verano

Estrato 2. Región Geográfica: Norte (Agua Prieta, Cananea, Santa Ana, Magdalena), Centro (Empalme, Hermosillo), Sur (Huatabampo, Obregón, Navjoa)

Estrato 3. Puntos de la cadena de producción (Establo, Lugar de Elaboración) y comercialización

En la Figura 1 se muestra un diagrama de bloques en el que se indican los puntos de la cadena de producción en que se tomaron muestras para aislar *L. monocytogenes*.

Toma de Muestras

Primer Muestreo

Ambiente

Se expusieron una o dos placas de TSA (Agar Soya Tripticasa; Difco, Co. 236950), dependiendo del tamaño del sitio a muestrear, durante 10 minutos. En el laboratorio se incubó la placa (Lab Line, Imperial III) por 24 horas a 35° C. Al finalizar el

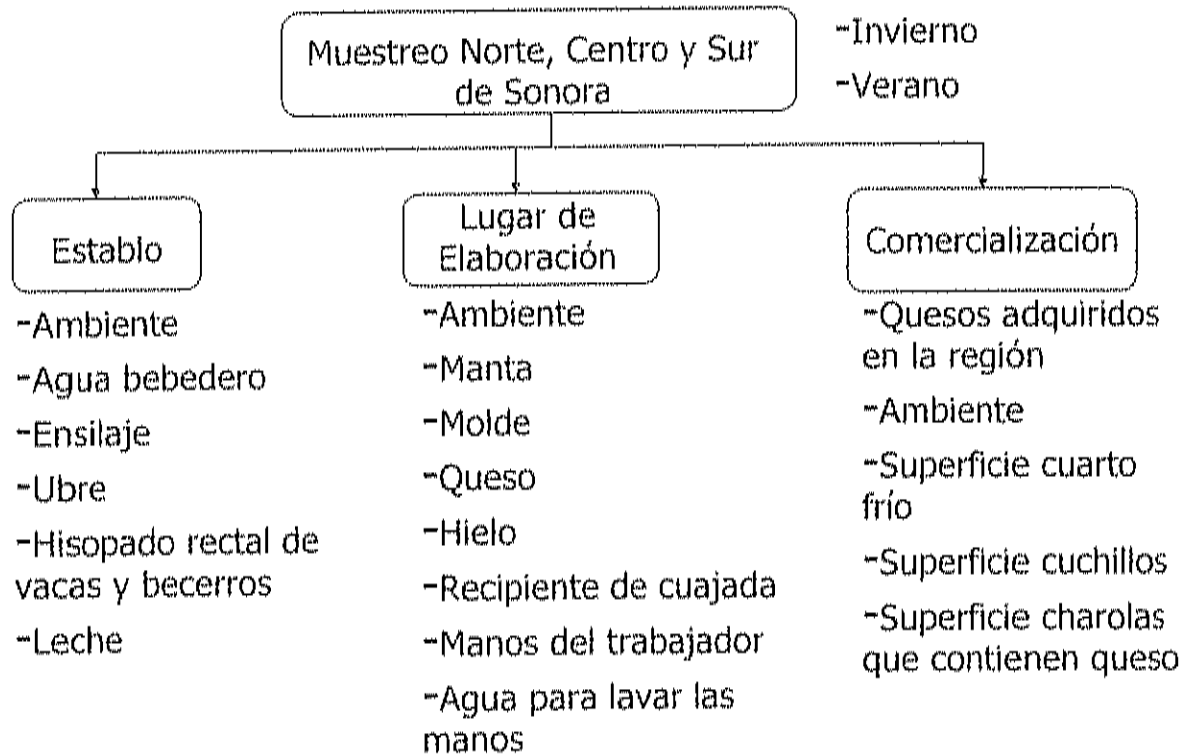


Figura 1. Puntos de toma de muestras para aislar *L. monocytogenes*.

tiempo, se vertieron en ésta aproximadamente 3 mL de TSB (Caldo Soya Tripticasa; Difco, Co. 211825) para recuperar las colonias que hubieran crecido, se homogenizó con un hisopo estéril y se colocaron en un tubo con 7 mL del mismo medio y esta fue la muestra que se procesó.

Agua

Se recolectó en un recipiente estéril un volumen aproximado de 500 mL. Cuando el agua se encontraba estancada se sumergió el recipiente a diferentes alturas y diferentes posiciones hasta completar el volumen requerido. En caso de que el agua fuera de un grifo o manguera, ésta se desinfectó con una solución clorada, después se dejó correr el agua por 50 segundos aproximadamente y posteriormente se colectó la muestra.

Ensilaje

Se tomaron aproximadamente 100 g de ensilaje con ayuda de un guante estéril y se colocaron en una bolsa estéril.

Ubre

Una vez finalizada la ordeña se limpió la ubre con una esponja humedecida con 100 mL de TSB estéril y en el laboratorio se procesó.

Hisopado

Un hisopo estéril humedecido con TSB se introdujo en el recto de la vaca o el becerro a una profundidad aproximada de 3 cm. Se realizaron series de movimientos circulares, hasta asegurar que al sacar el hisopo éste se encontrara impregnado de heces. Una vez colectada la muestra, el hisopo se colocó en el tubo con TSB. En el laboratorio se incubaron los tubos por 24 horas a 35° C y se procesó.

Heces

Se separó la parte superior de éstas y se tomó la muestra del interior con ayuda de una bolsa estéril.

Leche

Se ordeñó directamente en una bolsa estéril hasta coleccionar un volumen aproximado de 100 mL. Es importante mencionar que los primeros mL de la ordeña no fueron tomados como muestra. En el caso de la mezcla de leches (leche total), se tomó en el contenedor con ayuda de un recipiente estéril, el cual fue sumergido a diferentes profundidades y posiciones hasta completar un volumen de aproximadamente 400 mL.

Manta

Una manta, preferentemente recién utilizada en la elaboración del queso, fue tomada con guantes estériles y colocada en una bolsa estéril para transportarla al laboratorio. Para procesarla se le adicionaron 100 mL de TSB y se homogenizó en Stomacher (IUC Instruments, modelo CE98).

Molde, recipiente de cuajo y superficies

Se adquirieron en la quesería moldes utilizados recientemente para la elaboración de quesos. Se tomaron con guantes estériles y se colocaron en una bolsa estéril. En el caso del recipiente de cuajada, se muestreó en la quesería. Estas muestras así como las superficies de recipientes, tanques, piso, mesa, cubeta, charolas y cuchillos, se tomaron de acuerdo al procedimiento descrito por la Secretaría de Salud (Parrilla y Saldade, 1990). Éste consiste en sacar una esponja sumergida en el medio de dilución (en este caso TSB) con ayuda de un guante estéril y frotar vigorosamente con la esponja el área a muestrear, colocar la esponja en la bolsa con el medio y cerrarla para su transporte.

Hielo

Se tomó directamente en una bolsa estéril con ayuda de un guante estéril una cantidad de aproximadamente 500 g. En el laboratorio si el hielo aún no se derretía para su procesamiento, éste era colocado en el refrigerador hasta que se convertía en agua.

Manos del trabajador

Se realizó lavado de manos al productor de queso, con 100 mL de TSB que contenía 100 µl de tergitol aniónico NP-10 (Fluka, Co.). Se introdujo la mano derecha en una bolsa estéril, posteriormente se añadieron aproximadamente 50 mL del medio y se lavó la mano. Después se retiró y se introdujo en la misma bolsa la mano izquierda, se añadió el resto del medio y se lavó la mano.

Queso

Se adquirieron en los mercados y tiendas locales aproximadamente 250 g de queso, de la manera en la que se vende normalmente a los consumidores.

Estas muestras se procesaron de acuerdo a la NOM-143-SSA1-1995 (SSA, 1995).

Segundo Muestreo

Una vez identificada la zona de mayor contaminación, considerando el sitio con mayor número de muestras positivas, se realizó un segundo muestreo. En la toma de agua y de superficies se hicieron algunos cambios, los cuales se mencionan a continuación. El resto de las muestras se tomó como se indicó anteriormente.

Agua

Se recolectó como se indicó anteriormente pero en el mismo lugar de muestreo, a partir del recipiente con el que se tomó la muestra, se midieron 25 mL de ésta con ayuda de un tubo Falcon estéril y se pusieron en un bote que contenía 225 de caldo EB [Caldo soya tripticasa con 0.6% de extracto de levadura (Difco, Co. 288620), más suplementos: Clorhidrato de acriflavina (Sigma, Co.), ácido nalidixico (Spectrum, Co.), cicloheximida (Sigma, Co.)]. Una vez en el laboratorio, este recipiente se incubó por 48 horas a 30° C (VWR Scientific, modelo 2300) y se continuó con el aislamiento de acuerdo a la NOM-143-SSA1-1995.

Molde, recipiente de cuajo y superficies

Las muestras de moldes, recipiente de cuajada, así como las de superficie de cuarto frío, tanques, charolas y cuchillos, se tomaron de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, pero se utilizó como medio de dilución 100 mL de caldo EB. En el laboratorio, las bolsas con esponja se homogenizaron en Stomacher, se les retiró la esponja en condiciones asépticas y se adicionaron 150 mL de medio EB, se incubaron a 30° C por 48 horas y se continuo con el aislamiento de acuerdo a la NOM -143-SSA1-1995.

Las muestras de esta etapa se trabajaron con la técnica descrita por la NOM-143-SSA1-1995 (SSA, 1995).

Tercer Muestreo

Para esta última etapa, las muestras de agua, ensilaje, leche total (mezcla de leches), manos del trabajador y queso se tomaron de acuerdo a los procedimientos descritos en la primera parte. El resto de las muestras se tomo como se indica a continuación:

Ubre

Una vez finalizada la ordeña se limpiaba la ubre con una esponja humedecida con 10 mL de Regulador de Fosfatos de Butterfield, y se ponía en una bolsa que contenía 225 mL de medio UVM (Medio de la Universidad de Vermont; Oxoid, Co.). En el laboratorio se incubó a 30° C por 24 horas y se continuó con el enriquecimiento secundario descrito en la técnica de la USDA (2002).

Manta

Una manta, preferentemente recién utilizada en la elaboración del queso, fue tomada con guantes estériles y colocada en una bolsa que contenía 250 mL de UVM. En el laboratorio se incubó a 30° C por 24 horas y se continuó con enriquecimiento secundario de la técnica descrita por la USDA (2002).

Molde, recipiente de cuajo y superficies

Las muestras de recipientes de cuajada, tarja, pared, mandil, drenaje, piso, utensilios de cuajada y superficies de cuarto frío se tomaron de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente, utilizando como medio de dilución 100 mL de caldo UVM. En el laboratorio se completaron 250 mL de UVM, se incubó a 30° C por 24 horas y se continuó con enriquecimiento secundario de la técnica descrita por la USDA (2002).

Para trabajar estas muestras se realizó el aislamiento de cepas de *L. monocytogenes* de acuerdo a la técnica descrita por la USDA (2002).

Las muestras de las tres partes del trabajo se transportaron al laboratorio en hieleras que contenían refrigerantes. El agua, superficies y lavado de manos se procesaban inmediatamente al llegar, el resto de muestras se guardaban en refrigeración para su procesamiento al día siguiente.

Aislamiento de *L. monocytogenes* por NOM-143-SSA1-1995 (SSA, 1995)

Enriquecimiento

De la muestra se tomó una porción representativa y se colocaron 25 g ó 25 mL en un recipiente que contenía 225 mL de medio EB, para homogeneizar e incubar 48 h a 30° C. Para aquellas muestras de las que no se pudo obtener 25 g se tomaron 2.5 g o mL y se adicionaron 22.5 mL de EB.

Aislamiento

Al terminar la incubación con EB se sembraron en OXA (Agar Oxford; Difco, Co. 222530) y LPM (Agar Cloruro de Litio Feniletanol-Moxolactam; Difco, Co. 222120). Las placas de LPM se incubaron a 30° C y las de OXA a 35° C por 48 horas. Después de transcurrido ese tiempo se seleccionaron de 5 a 10 colonias características de cualquiera de los dos medios, se sembraron en placas de ASTEL (Agar Soya Tripticasa con 0.6% de Extracto de Levadura) y se incubaron las placas a 35° C por 24 horas.

Identificación

A partir de las cepas sembradas en ASTEL se realizó la identificación de las colonias sospechosas.

a) Movilidad en fresco. Se observó al microscopio, una preparación en fresco que se realizó suspendiendo colonias de la bacteria en solución salina al 0.85% (entre porta y cubreobjetos), hasta conseguir una suspensión densa.

b) Prueba de catalasa. Se emulsificó en un portaobjetos, un cultivo puro con una gota de peróxido al 3%.

c) Tinción Gram. Se realizó con cultivos de 16 a 24 horas de acuerdo a la técnica descrita por Forbes (1998).

Aquellas cepas que dieron reacción positiva a las pruebas anteriores se les realizó la prueba de fermentación de ramnosa, para lo cual se inocularon en tubos de caldo púrpura [Peptona Proteasa 1.0% (Bioxon, Co.), cloruro de sodio 0.5% (JT Baker, Co.), extracto de carne 0.1% (Difco, Co. 211520), púrpura de bromocresol 0.002% (Sigma, Co.)] al 0.5% de ramnosa (Sigma, Co.) y se incubaron 7 días a 35° C.

A estas mismas colonias y a la par de fermentación de ramnosa se realizó amplificación por PCR del gen *hlyA*, siguiendo la técnica descrita por Iñiguez (2002). La extracción de ADN cromosomal se realizó mediante lisis rápida de colonia, para esto se colocaron 50 µl de Tris (10 mM pH 7.5; Sigma, Co.) en un microtubo estéril y con un palillo estéril se tomó una colonia de *L. monocytogenes* sembrada en ASTEL. Se homogenizó con un vortex (Lab-Line Instruments, Inc.) y se adicionaron 5 µl de mutanolisina (2U/µl; Sigma, Co.), se incubó 2 horas a 37° C. Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min (Eppendorf, modelo 5415C). El sobrenadante se desechó y el precipitado fue resuspendido en 50 µl de Tris (10 mM, pH 9) con tritón X100 (1.0%; JT Baker, Co.). El homogenizado se dejó por 10 min en agua hirviendo e inmediatamente después en hielo, la mezcla obtenida se utilizó para amplificar por PCR.

La mezcla de reacción contenía 10 mM de una mezcla de dNTP (dGTP, dCTP, dATP, 2.5 mM c/u; Promega Co.), 25 pM de cada iniciador (Lys1 5' AACCTATCCAGGTGCTC 3', Lys2 5' CGCCACACTTGAGATAT 3'; MWG-Biotech, Co.), MgCl₂ (1mM; Promega, Co.), agua bidestilada estéril (cbp 50 µl), 5 µl de ADN de la muestra y 2U de Taq polimerasa (Promega, Co.). Esta mezcla se colocó en el termociclador a las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización a 96° C por 5 min, amplificación por 36 ciclos a 94° C por 1 min, 50° C por 1 min y 72° C por 1 min, extensión final a 72° C por 5 min (Techgene Modelo FTGENE 5D).

El gel de electroforesis se preparó con agarosa (1.0%, Sigma, Co.) en buffer Tris-Borato-EDTA 1X (TBE 5X: 54 g Tris, 27.5 mL ácido bórico, 20 mL EDTA 0.5 M pH

8.0, se diluye 1 vol de TBE 5X con 4 de agua) y se adicionó 1 μ l de bromuro de etidio (10 mg/mL; Bio-Rad, Co.). Se mezclaron 30 μ l de la muestra con 5 μ l de buffer de carga (Glicerol 30%, azul de bromofenol 0.25%, xilenocianol FF 0.25%; Sigma, Co.) y se colocaron en el gel submarino (TBE 1X). El marcador de peso molecular utilizado fue PCR Markers (Promega, Co.) mezclando 1 μ l de buffer de carga (Promega, Co.) y 5 μ l del marcador. Las condiciones de electroforesis 75 V, 65 min (Bio-Rad Power/Pac 200), el gel se observó en un equipo Ultra Lum, Inc. Modelo EBW-20 y se fotografió con una cámara Fotodyne EPH-7.

Para aquellas colonias que fueron positivas para fermentación de ramnosa y/o PCR se les realizaron las pruebas bioquímicas confirmativas que son:

a) Hemólisis. En una placa de agar sangre (Difco, Co. 211037) se inoculó por picadura el cultivo y se incubó 48 h a 35° C.

b) Reducción de Nitratos. Se inocularon tubos que contenían caldo nitratos (Difco, Co. 226810) y se incubaron a 35° C por 5 días. Transcurrido ese tiempo se adicionaron 0.2 mL de reactivo A [α -naftilamina (Sigma, Co.) al 0.5% en ácido acético 5N (JT Baker, Co.)] y 0.2 mL de reactivo B [Ácido sulfanílico (Merck, Co.) al 0.8% en ácido acético 5N]. Si no se observaba una coloración roja se adicionó zinc en polvo (Sigma, Co.) y se esperó una hora para observar la formación de color rojo.

c) Movilidad en agar. Se inoculó en medio SIM (Difco, Co. 211578) y se incubó por 7 días a 25° C.

d) Utilización de carbohidratos. Se inocularon tubos con caldo púrpura al 0.5% de dextrosa (JT Baker, Co.), maltosa (Sigma, Co.), manitol (Sigma, Co.) y xilosa (Sigma, Co.) y se incubaron 7 días a 35° C. Para probar la utilización de esculina las cepas se sembraron en OXA.

e) Prueba de Christie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP). En una placa de agar sangre se sembró una estria de una cepa de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y

paralelamente una de *Rhodococcus equi* (ATCC 6939). Entre éstas se sembraron perpendicularmente las cepas sospechosas y se incubaron 48 horas a 35° C.

En todas las pruebas bioquímicas se utilizó la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, como control positivo.

Serología

Se tomó una asada de cultivo de 24 horas en ASTEL y se colocó en 5 mL de solución salina. Se colocaron los tubos en baño de agua hirviendo por una hora, después de ese tiempo se centrifugaron a 3,500 rpm por 18 minutos. Se desechó el sobrenadante y con el resto se resuspendió el cultivo. Se colocó una gota de antisuero (*Listeria* O Antiserum Poly. Serotypes 1,4. Difco, Co. 223021) diluido 1/20 con solución salina y una gota de cultivo resuspendido. Se utilizó la cepa *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 como control positivo y solución salina como control negativo (Seeliger y Hohne, 1979).

Aislamiento de *Listeria monocytogenes* por la técnica del
Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2002)

Enriquecimiento primario con caldo UVM

Se pesaron o midieron 25 g ó mL de muestra y se colocan en una bolsa estéril, a la que se adicionaron 225 mL de caldo UVM. Se incubaron a 30° C por 24 horas.

Enriquecimiento secundario en FB (Caldo Fraser)

Se transfirieron 0.1 mL de caldo UVM a un tubo con 10 mL de caldo Fraser (Sigma, Co.) y se incubaron a 35° C por 48 horas. Después de este tiempo los tubos se observaron y si existía cualquier coloración negra se sembraron en MOX (Modified Oxford Agar, Difco Co. 222510) y se incubaron 35 °C por 48 horas.

Purificación y aislamiento

De las colonias sospechosas en MOX se tomaron 5 y se sembraron en ASTEL para purificarlas. Una vez puras se les realizó la prueba de hemólisis y se seleccionaron aquellas colonias que fueron β -hemolíticas.

Identificación

Para identificar las cepas se les realizó PCR y prueba de ramnosa. A aquellas cepas que dieron positivo para cualquiera de estas pruebas se les confirmó mediante las pruebas de reducción de nitratos, movilidad en agar, utilización de carbohidratos, prueba de CAMP y serología. Todas las pruebas se realizaron como se describió anteriormente y se utilizó como control la cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 7644.

Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

La técnica que se siguió fue la descrita por Graves y Swaminathan (2001).

Elaboración de los discos

Se sembraron las cepas en Agar BHI [Caldo BHI (Difco, Co. 237500) con 1.5% de agar (Difco, Co. 214010)] y se incubaron de 18 h a 37° C. Después de este tiempo

se transfirieron las células a tubos con TE [Tris-HCl 10 mM, pH 8 (Sigma Co.); EDTA 1 mM (Fermont, Co.)], y se ajustó la densidad óptica (610 nm) a 1.4 ± 0.05 (Spectronic Milton Roy 21D). Se transfirieron 400 μ l de la suspensión celular a microtubos que contenían 100 μ l de solución de lisozima (10 mg/mL; Sigma, Co.) y se incubó a 37° C por 15 min. Se adicionaron 15 μ l de solución de proteinasa K (20 mg/mL; Invitrogen, Co.) a microtubos y se agregaron 150 μ l de solución de agarosa/SDS tibia [Agarosa de bajo punto de fusión al 1.8% en agua (Cambrex, Co.); SDS al 1.0% (Sigma, Co.)] y 150 μ l de la suspensión celular. Después se succionó con jeringa de insulina y se dejó solidificar 20 minutos a 4° C.

Lisis

Se cortaron discos de agarosa con ayuda de un cubreobjetos estéril y se colocaron en 5 mL de buffer de lisis que contenía Tris 50 mM pH 8.0, EDTA 50 mM pH 8.0, lauril sarcosinato de sodio 1.0% (Sigma, Co.) y 31 μ l de solución de proteinasa K (20 mg/mL). Se incubaron por 4 h a 55-56° C en un baño con agitación (Lab Line). Posteriormente se realizaron dos lavados a los discos con 15 mL de agua estéril a 50° C por 10 minutos cada uno y tres con 15 mL de TE a 50° C por 15 minutos cada uno.

Digestión de los discos

Se preparó la solución de digestión con 885 μ l de agua, 100 μ l buffer para *Sma*I (Sigma, Co.) y 15 μ l de *Sma*I (Sigma, Co.). Se colocaron 100 μ l en un microtubo con 1 disco y se dejaron incubando por 4 horas a 30° C.

Electroforesis de Campo Pulsado

Se preparó un gel de agarosa para campo pulsado (Cambrex, Co.) a una concentración del 1% con TBE 0.5X. Se colocaron los discos digeridos y 5 μ l (0.1 μ g/ μ l) de marcador de peso molecular (5 Kb; Bio-Rad, Co.).

La electroforesis se llevó a cabo en un equipo CHEF-DR III (Bio-Rad) bajo el siguiente protocolo: Pulsos 4-60, 10 horas, 6 V/cm, 120°, temperatura 14° C. Finalmente se tiñó el gel en una solución acuosa de bromuro de etidio 7×10^{-4} mg/mL. Se observó en el transiluminador y se tomó fotografía.

Análisis de Restricción del ADN Amplificado por PCR (ARDRA)

Se realizó lisis rápida de colonia y reacción de PCR como se describió anteriormente, en la identificación de *Listeria monocytogenes*, con la diferencia que se utilizaron los iniciadores 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGCACCTTGTACGACTT-3'). Al terminar la amplificación se tomaron 30 μ l del amplicón y se mezclaron con 5 U de enzima resuspendida en amortiguador de acuerdo a las especificaciones del fabricante, se homogenizó y se incubó 4 horas a 37 °C. Las enzimas que se probaron fueron: *Eco* RI, *Alu* I, *Hap* II y *Sau* 3AI (BioEngland, Co.). Se corrió un gel de electroforesis convencional, por 90 minutos, con las condiciones descritas para PCR y se fotografió (Acedo-Félix y Pérez-Martínez, 2003).

Análisis Estadístico

- ↻ Para comparar y estimar significancias ($p < 0.05$) entre las proporciones obtenidas, se realizaron pruebas de hipótesis para dos proporciones con el estadístico Z. Para la comparación de tres proporciones se utilizó la prueba de chí cuadrada (Daniel, 1995), todo esto en el programa NCSS 2001 (Hintze, 2001).

- ↻ A partir de los patrones de PFGE y ribotipado se elaboraron dendrogramas en el sistema NTSyS 2.02 (Applied Biostatistics, 1998), por el procedimiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), con la finalidad de observar el grado de similitud entre las cepas obtenidas (Bridge, 1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primer Muestreo

Se tomaron 381 muestras, las cuales se encuentran distribuidas de acuerdo a las tablas 2, 3 y 4, donde se observa el número de muestras tomadas en cada punto en Invierno y Verano en cada zona del Estado.

Durante los muestreos se visitaron pequeños y medianos productores puesto que la mayoría del queso fresco es elaborado de manera artesanal. Los hatos donde se tomaron muestras, eran pequeños (no más de 30 vacas), en algunos se contaba con ganado estabulado, pero en otros las vacas se ordeñaban y se dejaban para el libre pastoreo, o se intercalaban los métodos de alimentación dependiendo de la época. Esto contribuyó a que en ocasiones se pudieran tomar muestras de alimento y otras no. Las muestras de becerros, sólo pudieron tomarse cuando éstos se encontraban en los hatos que se visitaron.

El lugar de elaboración la mayoría de las veces consistió en pequeñas áreas designadas para este propósito en la casa del productor y en contadas ocasiones se visitaron medianas empresas, que dedican una parte de su producción a la elaboración de queso fresco. Con los pequeños productores se encontró que no existían las condiciones higiénicas adecuadas para la elaboración del producto, en las empresas se cuidaban mejor estos aspectos. En cuanto al sitio de comercialización, los quesos se adquirieron en minisupers, abarrotes y supermercados y se compraban en las condiciones en las que normalmente se venden al consumidor, es decir, se pedía el producto y la bolsa donde lo entregaban se cerraba para ser transportada en hieleras para su análisis en el laboratorio. Es importante mencionar que algunas muestras de superficies sólo se tomaron en Verano, esto se hizo porque se decidió incrementar el número de muestras de superficies para aumentar la probabilidad de encontrar muestras positivas para *L. monocytogenes*.

Tabla 2. Número de muestras tomadas en zona Sur del Estado de Sonora (Huatabampo, Obregón, Navojoa) en Invierno y Verano, para cada uno de los puntos establecidos.

DESCRIPCIÓN	MUESTRAS	
	Invierno	Verano
Ubre	5	12
Heces vaca	1	0
Hisopado vaca	8	15
Heces becerro	1	0
Hisopado becerro	10	4
Ensilaje	2	4
Ambiente rancho	2	3
Agua bebedero	1	5
Leche	5	12
Leche total	1	4
Ambiente quesería	1	0
Superficie mesa de trabajo	0	1
Superficie tanque de leche	0	1
Lavado de manos	0	2
Queso	13	50
TOTAL	50	113

Tabla 3. Número de muestras tomadas en zona Centro del Estado de Sonora (Empalme, Hermosillo) en Invierno y Verano, para cada uno de los puntos establecidos.

DESCRIPCIÓN	MUESTRAS	
	Invierno	Verano
Ubre	5	8
Hisopado vacas	10	8
Hisopado becerros	10	0
Ensilaje	1	2
Ambiente rancho	1	2
Agua bebedero	3	3
Leche	5	8
Leche total	2	5
Ambiente quesería	1	3
Superficie piso y alrededor del drenaje	1	0
Agua tanque de lavado de manos	1	2
Lavado de manos del productor	1	2
Superficie cubeta para manipular cuajada	1	1
Recipiente de cuajada	1	2
Molde de queso	1	0
Hielo	1	1
Manta de queso	1	3
Queso	11	15
Superficie cuchillo para despachar queso en tienda	0	2
Superficie de charola que contiene queso en tienda	0	2
Ambiente tienda	0	2
TOTAL	57	71

Tabla 4. Número de muestras tomadas en zona Norte del Estado de Sonora (Agua Prieta, Cananea, Santa Ana, Magdalena) en Invierno y Verano, para cada uno de los puntos establecidos.

DESCRIPCIÓN	MUESTRAS	
	Invierno	Verano
Ubre	3	3
Hisopado vaca	3	3
Hisopado becerro	3	3
Ensilaje	1	1
Ambiente rancho	1	1
Agua bebedero	1	1
Leche	3	3
Ambiente quesería	1	1
Recipiente de cuajada	1	1
Molde de queso	1	1
Manta de queso	1	0
Queso	22	31
TOTAL	41	49

Una vez obtenidas las muestras se detectó la presencia de *Listeria monocytogenes* mediante la NOM-143-SSA1-1995 (SSA, 1995), al sembrar las muestras en agares OXA y LPM se seleccionaron las colonias sospechosas, en el caso de LPM fueron blanco o azul iridiscente y en OXA se tomaron las colonias negras con una halo negro debido a la hidrólisis de esculina y que mostraban una depresión en el centro. Estas cepas se purificaron y se les realizaron pruebas bioquímicas presuntivas para identificar si pertenecían al género *Listeria*: Con las pruebas de movilidad en fresco, tinción Gram y catalasa, se seleccionaron los bacilos cortos con movilidad rotatoria como si brincaran, Gram positivos y que fueron catalasa positiva, esto se observó con la formación de burbujas al agregar peróxido al 3%.

Posteriormente se realizaron las pruebas de fermentación de ramnosa y amplificación por PCR de un fragmento de 520 pb del gen *hlyA*, que es característico de *Listeria monocytogenes*. En la Figura 2 se muestra el gel obtenido después de esta amplificación. La técnica de PCR fue utilizada como tamiz para detectar cepas de *Listeria monocytogenes* en menor tiempo, sin esperar que transcurrieran los 7 días descritos por la NOM, también se utilizó la prueba de fermentación de ramnosa con este mismo fin. Se decidió emplear este carbohidrato porque sólo *L. monocytogenes* y *L. innocua* lo fermentan. No se podía emplear sólo amplificación por PCR puesto que existen algunas cepas de *L. monocytogenes* no hemolíticas, esto debido a que no se esté expresando el gen *hlyA* por mutaciones en éste o bien no lo presenten por una pérdida espontánea del mismo. Esta ausencia o mutación provoca que no se manifieste la β -hemólisis y también que la amplificación por PCR no se de, provocando que se eliminen cepas de esta especie creyendo que son de otras especies de *Listeria* no hemolíticas (Farber and Peterkin, 1991; Vazquez-Boland, 2001). Sin embargo, al no ser hemolíticas pero ramnosa positivo, es posible que sean *L. innocua* porque esta especie da resultados variables para la fermentación de este carbohidrato. La habilidad para discriminar adecuadamente *L. monocytogenes* de *L. innocua* es de importancia para identificar reservorios de *L. monocytogenes* ya que estas especies están muy relacionadas (Czajka, *et al.*, 1993; Rodríguez-Lázaro, *et al.*, 2004). Esta discriminación puede realizarse mediante serología, sin embargo esta prueba tiene poca especificidad y se han realizado sistemas que se basan en la presencia de arilamidasa en *L. innocua*

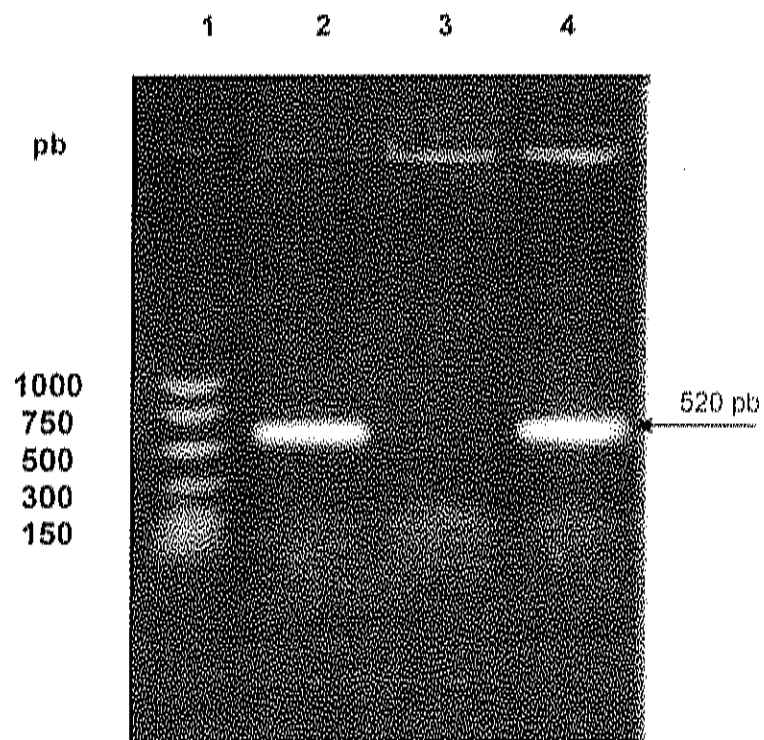


Figura 2. Amplificación por PCR de ADN de cepas aisladas de muestras problema
Carril 1, Marcador de Peso Molecular; Carril 2, Control Positivo *L. monocytogenes* ATCC 7644; Carril 3, Cepa Negativa; Carril 4, Cepa Positiva. La flecha indica la banda de amplificación del fragmento del gen *hlyA*.

para distinguirlos, así también pueden emplearse pruebas moleculares (Perrin *et al.*, 2003).

Cuando las cepas dieron reacción positiva para alguna de las dos técnicas (PCR y/o ramnosa), se confirmó que fueran *L. monocytogenes* mediante las pruebas bioquímicas que indica la NOM. En la prueba de hemólisis, se eligieron las cepas que presentaron una zona ligeramente clara alrededor del punto de picadura indicando que eran *L. monocytogenes* o *L. seeligeri*. En la prueba de reducción de nitratos, el desarrollo de un color rojo después de una hora de adicionar granalla de zinc, confirmó la prueba negativa que es el resultado para *Listeria spp.* Para la movilidad en agar se observó un crecimiento en forma de sombrilla en medio SIM. En la prueba de CAMP se observó sinergismo entre las hemolisinas de *S. aureus* y *L. monocytogenes*, manifestándose como una zona hemolítica más intensa en la zona de intersección. Después de la hidrólisis de carbohidratos se seleccionaron las cepas que dieron reacción positiva, observándose un cambio de color del medio de púrpura a amarillo, para dextrosa y maltosa y prueba negativa para xilosa y manitol; además se confirmó la presencia de halo negro de hidrólisis de esculina, después de sembrarse en OXA. Hubo dos cepas que a pesar de no presentar hemólisis y dar negativa la prueba de CAMP, se seleccionaron puesto que eran ramnosa positivo y el resto de pruebas bioquímicas coincidían con el género *Listeria*. Se obtuvieron 17 cepas, las cuales mediante serología se confirmó que eran *L. monocytogenes*, ya que todas presentaron aglutinación con los antisueros específicos empleados.

En las Figuras 3, 4 y 5 se observan los porcentajes de muestras positivas de acuerdo a los estratos planteados. En la Figura 3 puede observarse que, a pesar de no encontrar diferencia ($p > 0.05$) por época del año, la tendencia indica que la mayor recuperación de *Listeria monocytogenes* se obtuvo en invierno, lo cual es de esperarse, ya que ésta bacteria puede crecer a temperaturas bajas (Berrang, *et al.*, 2002). Otro aspecto a considerar es que en esta época el crecimiento de otros microorganismos (mesófilos) se ve disminuido y por lo tanto, la competencia por sustrato y espacio es menor, produciéndose un mayor crecimiento de *L. monocytogenes*.

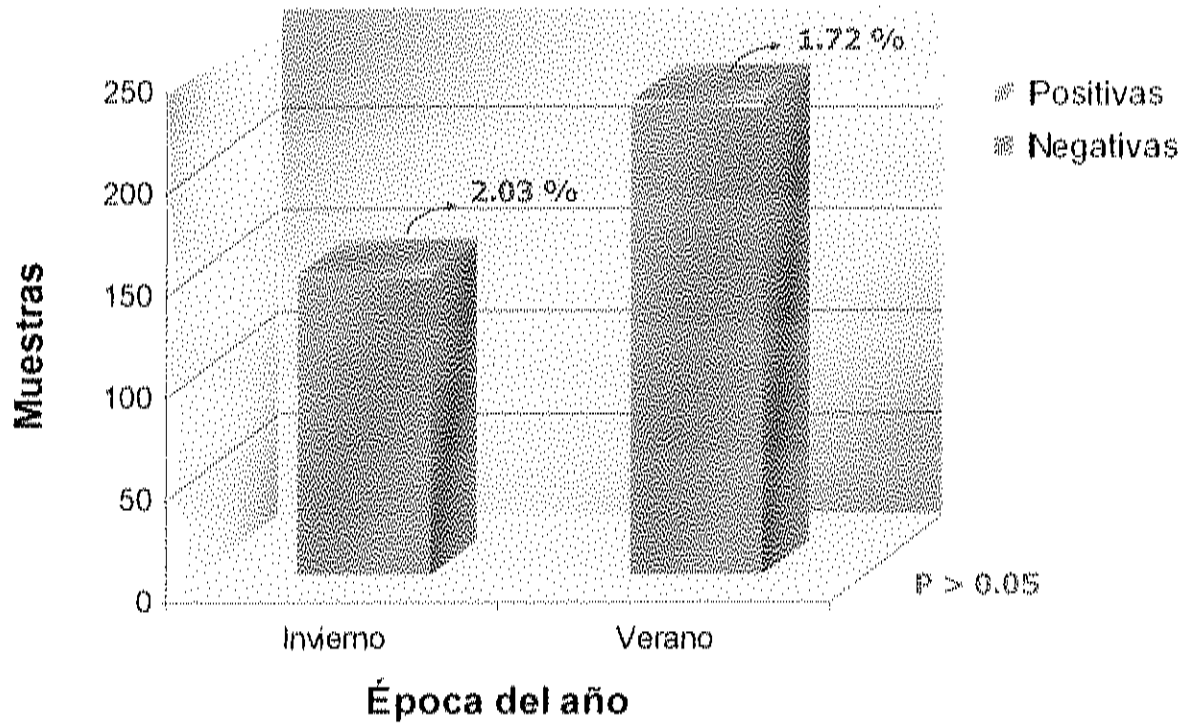


Figura 3. Porcentaje de muestras positivas para *Listeria monocytogenes* del total de muestras tomadas por época del año.

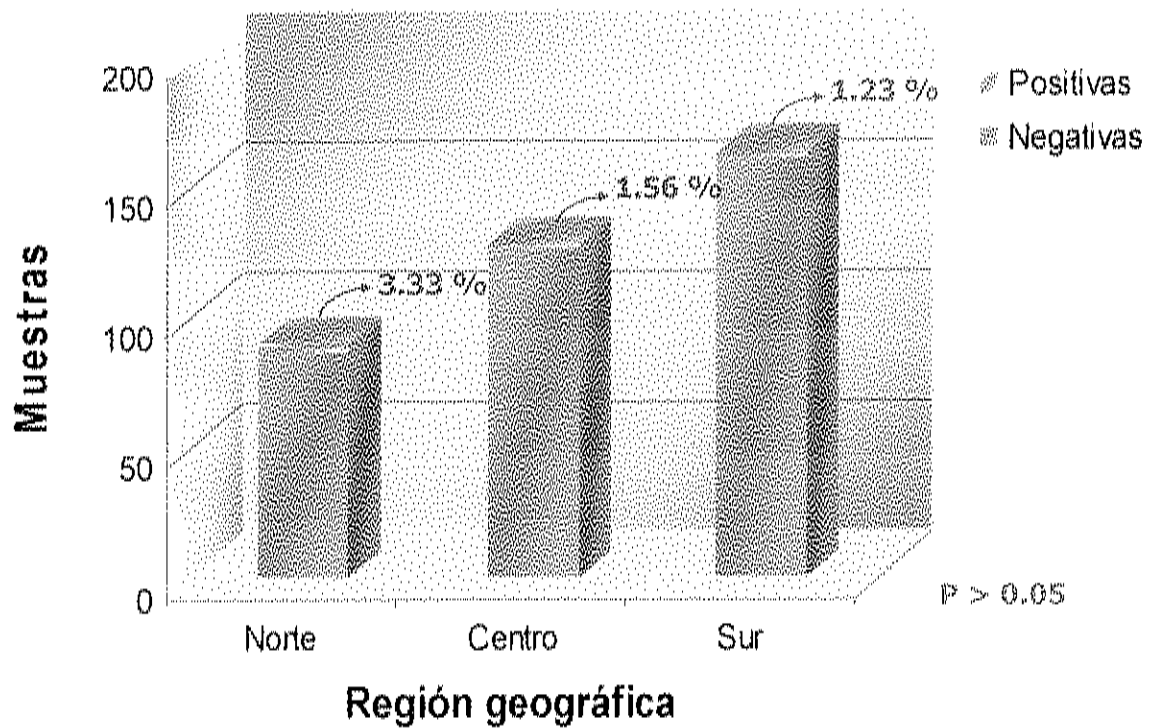


Figura 4. Porcentaje de muestras positivas para *Listeria monocytogenes* del total de muestras tomadas por región geográfica.

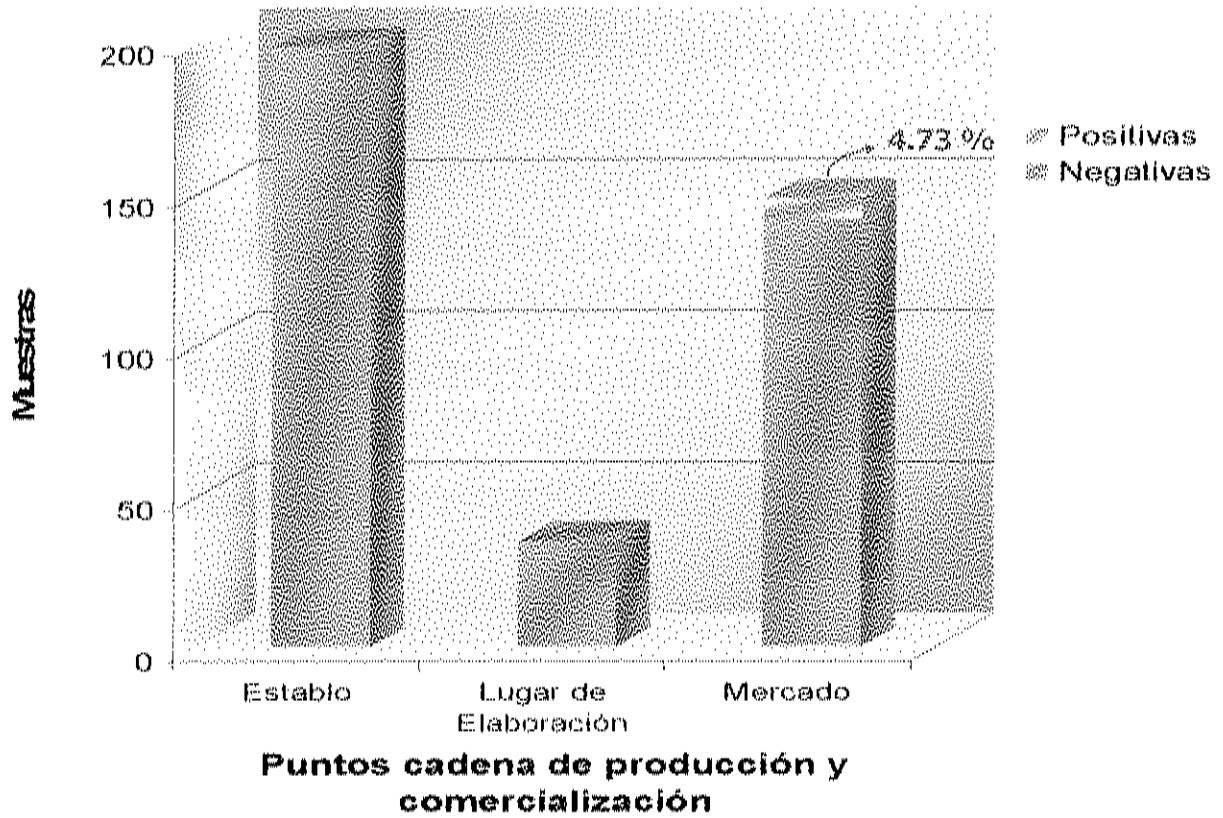


Figura 5. Porcentaje de muestras positivas para *Listeria monocytogenes* del total de muestras tomadas por puntos de la cadena de producción y comercialización.

En cuanto a los datos agrupados por región geográfica (Figura 4), tampoco se encontró diferencia ($p > 0.05$). Sin embargo, como tendencia puede observarse que en el norte fue donde se obtuvo un mayor porcentaje de muestras contaminadas con *L. monocytogenes*. Esto puede deberse a que las muestras positivas del norte se encontraron en invierno y en esa época dicha zona del estado es más fría que el resto. De acuerdo a INEGI en los meses de enero y febrero la temperatura media ambiental en el noreste de Sonora es inferior a 0° C, no produciéndose ese fenómeno desde las proximidades de Hermosillo hasta el límite con Sinaloa (INEGI, 2004).

Cuando se agrupan los datos por puntos de la cadena de producción (Figura 5), se encontró que todas las muestras positivas eran provenientes de queso. Como parte del proyecto total, además de *L. monocytogenes*, se analizaron otros patógenos como *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* y *Staphylococcus aureus*. Estos microorganismos fueron encontrados en diversos puntos de la cadena de producción, lo que sugiere que existe una competencia con *L. monocytogenes*, impidiendo su crecimiento. Sin embargo, una vez que se elabora el queso, éste se mantiene a temperatura de refrigeración, inhibiéndose el crecimiento de flora competitiva y favoreciendo el de *L. monocytogenes*.

También puede ocurrir que el método de aislamiento empleado no sea del todo sensible y se perdieron cepas por encontrarse en bajas cantidades. Por ejemplo, la leche cruda se ha descrito como la principal fuente de contaminación por *L. monocytogenes* en productos lácteos, pero se ha encontrado que la bacteria se presenta en bajas concentraciones, desde menos de 1 UFC/mL hasta 10 UFC/mL, (Bemrah, *et al.*, 1998; Kozak, *et al.*, 1996). En un estudio realizado para detectar la prevalencia de *L. monocytogenes* en queso fresco, se encontró que la NOM-143-SSA1-1995 tuvo menor poder de detección respecto a PCR (Iñiguez, 2002). También se menciona en la literatura que métodos de aislamiento de *L. monocytogenes* como los de la FDA (En el que se basa la NOM-143-SSA1-1995), no son del todo efectivos y cerca del 30% de las muestras positivas escapan a la detección, esto puede ocurrir porque existe sobrecrecimiento de otras especies de *Listeria* o bien de flora competitiva (Ryser, *et al.*, 1996).

Es de considerarse que en otros estudios en los que se han elucidado rutas de contaminación por *L. monocytogenes* en industrias cárnicas (Berrang *et al.*, 2002), plantas procesadoras de pescado (Fonnesbech, *et al.*, 2001; Norton *et al.*, 2001), plantas de salsas listas para consumo (Pourshaban, *et al.*, 2000) e industrias lácteas (Waak, *et al.*, 2002), las muestras se tomaron constantemente por períodos que van de seis meses a dos años. En la mayoría de los casos las muestras de superficies se tomaron con esponja sumergida en un medio específico para *Listeria spp.* o bien en regulador de fosfatos, pero el transporte al laboratorio de análisis se realizó en el medio de enriquecimiento. En este trabajo las muestras se transportaron en un medio general (TSB), probablemente con ello se favoreció el crecimiento de flora competitiva y los muestreos se realizaron en dos ocasiones, invierno y verano, no de manera constante.

Una vez aisladas las cepas, se procedió a caracterizarlas de manera genotípica mediante las técnicas de ARDRA y PFGE. Para la técnica de ARDRA primero se probó una cepa control (*L. monocytogenes* ATCC 7644) con las enzimas *Eco* RI, *Alu* I, *Hap* II y *Sau* 3AI, siendo la *Eco* RI la que generó mejores resultados y con ésta se digirieron las muestras. Los perfiles obtenidos, así como el dendrograma de asociación, pueden observarse en la Figura 6. Un perfil fue compartido por la cepa 4 y la cepa 6, mientras que las otras 15 cepas compartieron el segundo perfil. Las cepas que fueron diferentes del resto correspondían a una muestra de queso proveniente del Norte del Estado, recolectada en invierno. Sin embargo, al presentarse un coeficiente de similitud del 80% entre las cepas, se comprobó que todas pertenecían a la especie *L. monocytogenes*. Con esta técnica no se logró obtener una mayor discriminación, se menciona que aunque el polimorfismo de genes del ARNr se ha empleado para caracterizar especies bacterianas, para el género *Listeria* la diferenciación es difícil por la naturaleza altamente conservada de sus genes. En la secuencia del ARNr 16S, solamente dos dominios parecen variar en especies de *Listeria*, mientras que cuatro regiones han sido identificadas en el ARNr 23S (Paillard *et al.*, 2003). Sin embargo, Vaneechoutte *et al.* (1998) realizó la restricción con diferentes enzimas y al combinar los perfiles obtenidos logró identificar especies de *Listeria* excepto *L. innocua* y *L. welshimeri*, pero la técnica fue capaz de diferenciar entre dos subespecies de *L. ivanovii*.

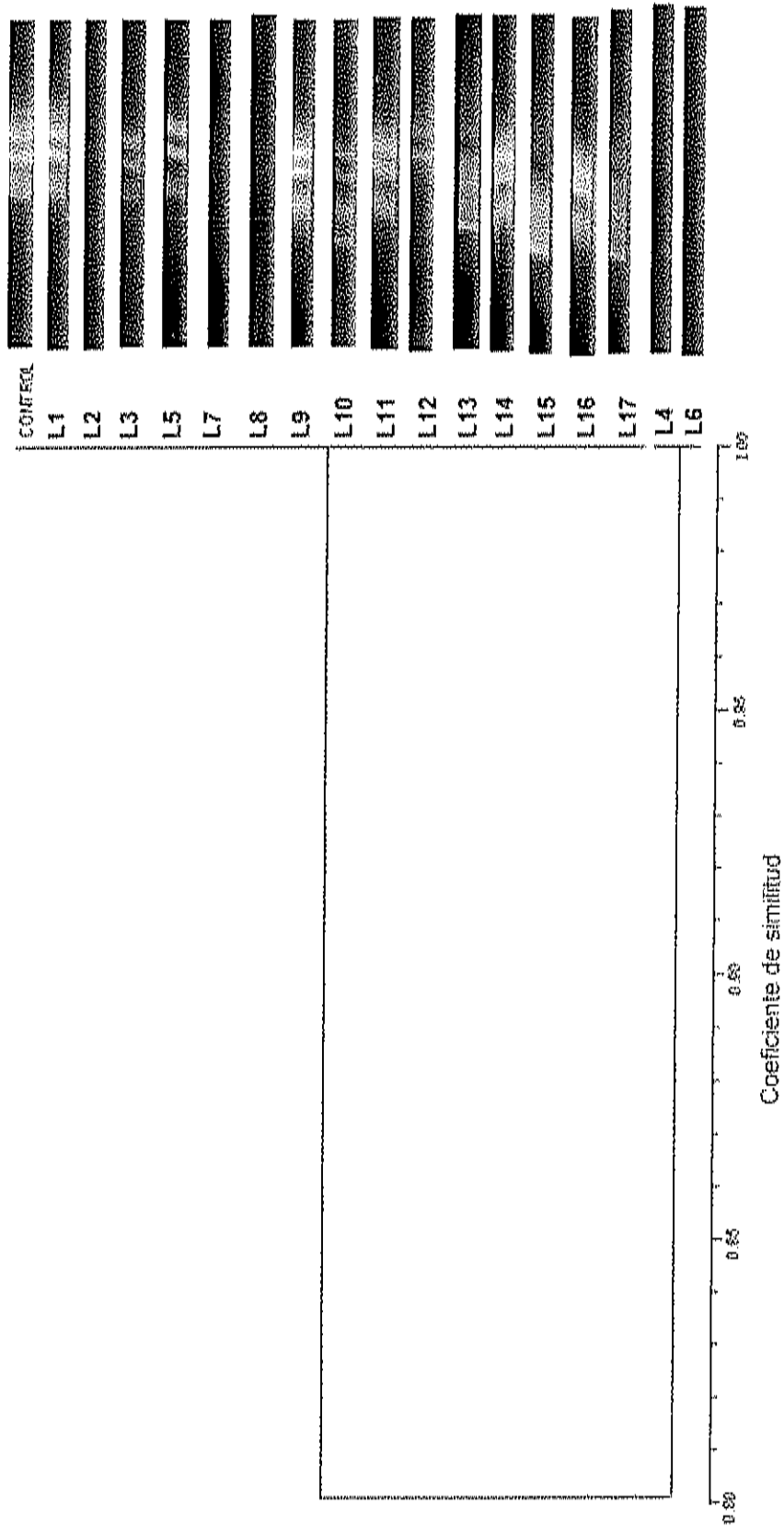


Figura 6. Perfiles generados por técnica de ARDPA y coeficientes de similitud obtenidos, a través de dendrograma de asociación, para las cepas aisladas en el primer muestreo.

L1-L17 = Cepa 1 - Cepa 17

Para realizar la técnica de PFGE se probaron varias modificaciones al protocolo descrito por García (2003) y se trabajó también con la técnica de Graves y Swaminathan (2001), hasta encontrar las condiciones óptimas para el estudio. En los geles se observa una mancha la cual intentó eliminarse con lavados con EDTA 50 mM antes de realizar el ajuste de la densidad óptica de las células, pero esto no se logró. Sin embargo, se lograron identificar las bandas y a partir de éstas se determinaron los perfiles con los que se analizaron las cepas problema.

En la técnica de Campo Pulsado se utilizó una sola enzima de macrorestricción, *SmaI*, y con ella se obtuvieron 17 perfiles, los cuales pueden observarse en la Figura 7. En el estudio realizado por Louie *et al.*, (1996) se compararon 51 cepas provenientes de brotes y casos epidemiológicos, y se encontró que por *Apal* se generaron 22 perfiles y por *SmaI*, 26. En el estudio de Jacquet *et al.* (1995) se observó que con *Apal* se generaron menos perfiles que con *SmaI*, esto también ocurrió en el estudio de Vela *et al.* (2001), sin embargo, en este trabajo se encontró que algunas cepas con perfil idéntico por *Apal*, fueron diferentes por *SmaI*, lo que indica que la combinación de ambas enzimas mejora el poder discriminante de la técnica. Esto también lo reportan estudios como el de Wagner y Allerberger (2003), donde por *AscI* se encontraron 30 perfiles y al combinar *Apal*, *SmaI* y *AscI* se encontraron 41 perfiles, o el estudio de Gianfranceschi *et al.* (2002) donde con *SmaI* hubo 26 perfiles y al combinarse con *Apal* se produjeron 32 perfiles. Por lo tanto la utilización de dos o más enzimas produce un mejor análisis que el empleo de sólo una.

Para realizar el dendrograma (Figura 7) se utilizaron ambas técnicas moleculares y en éste pueden observarse los estratos establecidos para el estudio. Se encontró que hay una tendencia de asociación por época del año, ya que hay dos grupos principales y éstos a su vez se dividen en otros dos que son los que separan la mayoría de las cepas de invierno o verano. La mayor cantidad de cepas aisladas en verano tienen coeficientes de similitud mayores de 0.61 y las aisladas en invierno tienen coeficientes mayores de 0.63. Es interesante considerar que los dos grupos se encuentran separados por cepas que fueron no hemolíticas (Cepa 1 y 7) y que además

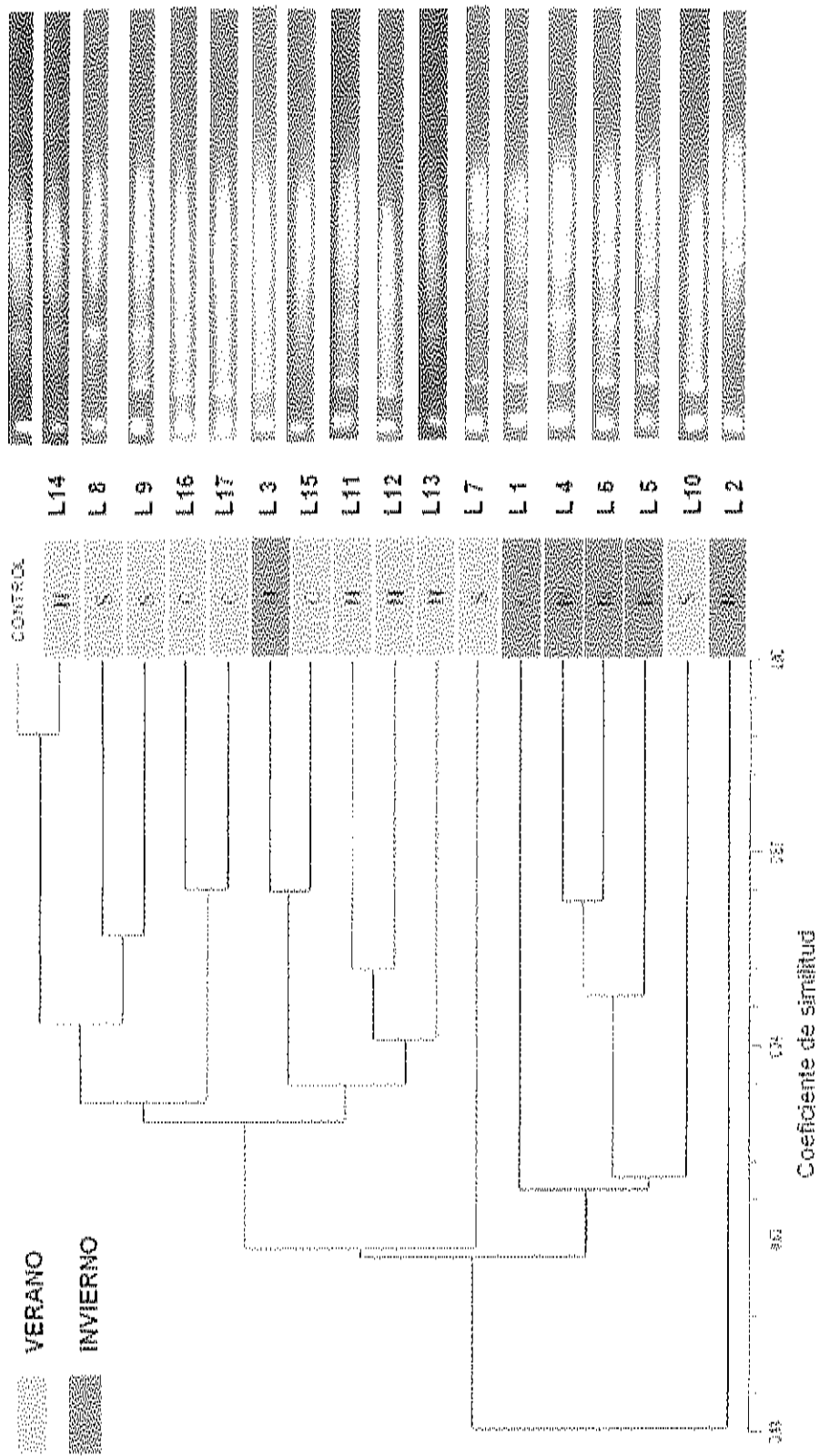


Figura 7. Perfiles generados por técnica de PFGE y coeficientes de similitud obtenidos por estrato, a través de dendrograma de asociación PFGE-ARDRA, para cepas aisladas en el primer muestreo.

N = Norte, S = Sur, C = Centro, L1-L17 = Cepa 1 a Cepa 17

la cepa 2 se considera diferente del resto, ya que su coeficiente de similitud fue del 0.48. Sin embargo, los resultados de ARDRA indican que aunque fue diferente del resto, pertenece a la especie *L. monocytogenes*. Esta cepa fue aislada en invierno en el norte del estado, junto con la cepa 3, que mostró una mayor asociación con el resto. Esto indica que en una misma muestra se encontraron dos cepas con una gran variabilidad genética, esto se ha puesto de manifiesto en estudios como el mencionado por Waak *et al.* (2002), en el que se estudiaron ribotipos de *Listeria* en leche cruda, y se encontró que ésta puede contaminarse con numerosos ribotipos endémicos del ambiente de la granja o en el estudio de Destro *et al.* (1996), en una planta de procesamiento de camarón, donde se recuperaron cepas de la misma muestra que tuvieron diferentes perfiles electroforéticos. También se observa que las cepas 4 y 6, que fueron las que compartieron un mismo perfil de ARDRA, muestran una similitud, entre ellas, mayor de 0.80.

Al considerar la región geográfica se observó tendencia de agrupación para las cepas del norte, sin embargo tiene que considerarse que hubo un mayor número de cepas aisladas en esta región. En el estudio de Buchrieser *et al.* (1993) se analizaron cepas aisladas de humanos infectados y de alimentos implicados brotes de listeriosis en Suiza, Estados Unidos (California) y Dinamarca y los patrones fueron indistinguibles, mientras que cepas de brotes en Canadá, Estados Unidos (Massachussets), Francia, Nueva Zelanda y Austria tuvieron mayor heterogeneidad en sus patrones de restricción, esto indica que no siempre se encuentra una asociación molecular de las cepas aisladas en distintas regiones de un mismo país o entre diferentes países.

Todas las muestras positivas pertenecían a queso, y de las 17 cepas se obtuvieron 17 perfiles, lo que indica que existe una gran variabilidad genómica entre las cepas de *Listeria monocytogenes* presentes en el queso regional. Sin embargo, no se puede concluir si en la misma región geográfica existen diferencias de acuerdo a la época, pero sí que en un mismo queso puede existir más de una cepa diferente. También es importante recalcar que la técnica de PFGE es muy discriminante y permite encontrar estas diferencias entre las cepas, esto se ha demostrado en varios estudios en los que se ha comparado esta técnica con otras como ribotipado y RAPD, y en los

que se ha visto que a pesar de ser PFGE la que genera mejores resultados, la combinación de técnicas permite un mejor análisis y mayor discriminación (Destro *et al.*, 1996; Louie *et al.*, 1996; Berrang *et al.*, 2002).

Segundo Muestreo

Al no determinarse el punto de contaminación, en la cadena de producción, se decidió realizar un segundo muestreo en el que las muestras de superficies y de agua se transportaron al laboratorio en caldo EB, el cual al contener antibióticos (Ácido Nalidíxico, Cicloheximida y Acriflavina), inhiben el crecimiento de flora competitiva y esto ayuda a la recuperación de las cepas de *L. monocytogenes* (Axelsson, 1998). Este muestreo se realizó en época invernal, en el norte del estado, puesto que los datos anteriores indicaban que se podría lograr una mayor recuperación de cepas bajo estas condiciones. Otro aspecto que se consideró fue que al realizar los muestreos en el mercado se encontró que muchos de los quesos eran producidos en Santa Ana, Hermosillo y Magdalena, a pesar de ser vendidos en el Centro y Sur del Estado. Además se encontró que algunos de los quesos analizados, positivos a la presencia del patógeno, provenían de Santa Ana, y eran elaborados en el rancho que se visitó. Las muestras tomadas, así como los resultados de este segundo muestreo, se pueden observar en la Tabla 5 y Figura 8.

En esta segunda etapa del proyecto, se observó que no hubo diferencia significativa entre lugar de procesamiento y mercado. Esto puede indicar que toda la contaminación en el producto se debe al lugar de procesamiento. Sin embargo, también puede ocurrir que no se estén recuperando cepas del establo, por los motivos mencionados anteriormente, flora competitiva o baja sensibilidad de la técnica. También es importante mencionar que las únicas muestras en las que se transportó con medio con antibióticos fueron las de agua y superficies, puesto que en muestras como ubres o lavado de manos no se pueden utilizar este tipo de compuestos ya que son muy tóxicos, esto también pudo influir en la recuperación.

Tabla 5. Número de muestras tomadas con medio de enriquecimiento para *L. monocytogenes*, para cada uno de los puntos establecidos.

DESCRIPCIÓN	MUESTRAS
Ubre	5
Hisopado vaca	5
Ensilaje	1
Ambiente rancho	2
Agua bebedero	1
Leche	5
Leche total	1
Ambiente quesería	1
Superficie tanque de leche	1
Superficie utensilios manejo cuajada	1
Agua quesería	1
Lavado manos	2
Recipiente de cuajada (azulejo)	1
Molde de queso	1
Hielo	1
Superficie cuarto frío	2
Queso	5
Superficie cuchillo para despachar queso en tienda	1
Superficie de charola que contiene queso en tienda	1
Ambiente tienda	1
TOTAL	39

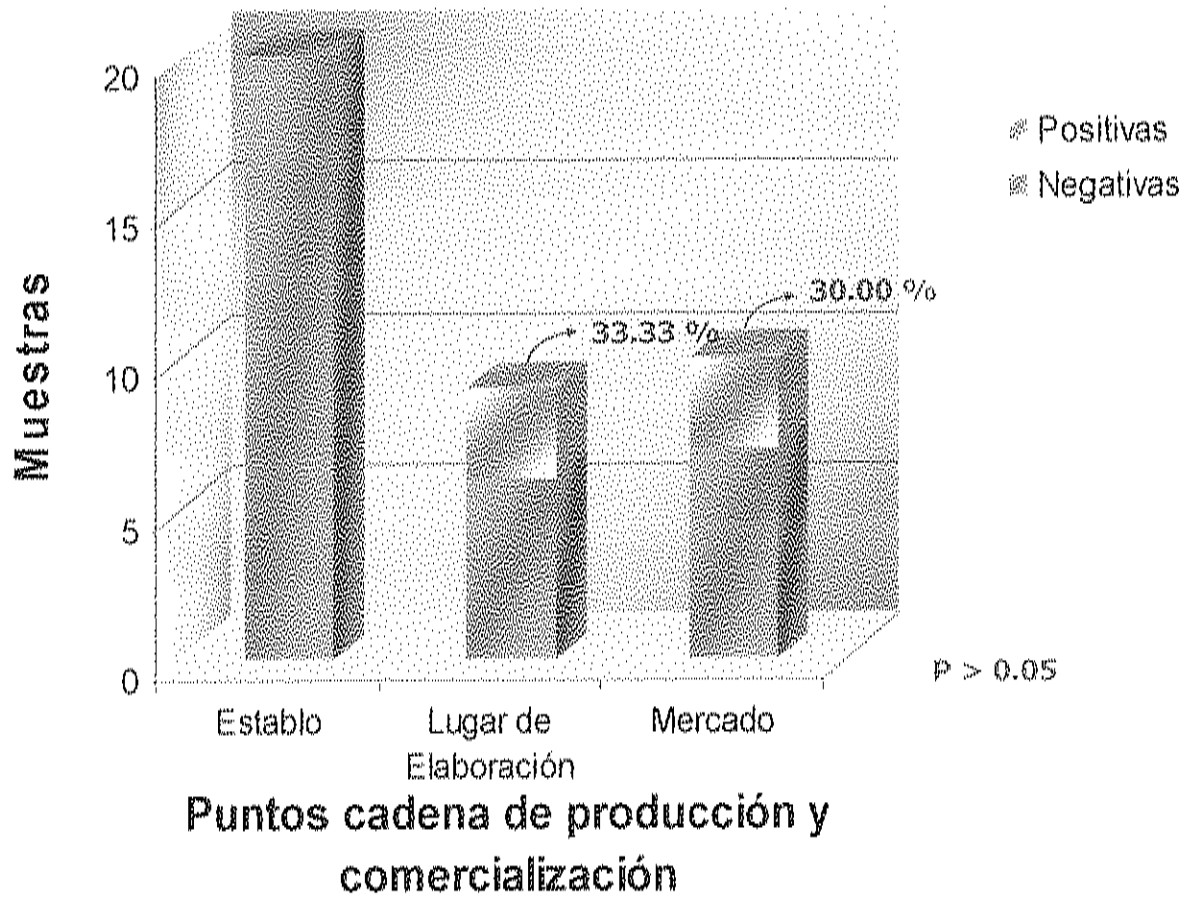


Figura 8. Porcentaje de muestras positivas para *Listeria monocytogenes* del total de muestras tomadas por puntos de la cadena de producción y comercialización para segundo muestreo.

En cuanto a las muestras positivas del lugar de procesamiento, todas provenían de superficies. De acuerdo a la bibliografía, *L. monocytogenes* puede formar biopelículas, lo cual le permite sobrevivir a condiciones ambientales adversas y a procesos de sanitización (Chavant *et al.*, 2002; Borucki *et al.*, 2003). En estudios realizados para elucidar rutas de contaminación en plantas de alimentos, como el de Fønnesbech *et al.* (2001), se ha observado que la mayor parte de las cepas recuperadas provienen de superficies de procesamiento. Un estudio citado por Midelet y Carpentier (2002) sugiere que el 40.5% de los brotes de listeriosis provocados por alimentos registrados en Francia en 1996, están relacionados a la contaminación del equipo. Es posible que el microorganismo en estas superficies esté formando biopelículas, y de ahí provenga la contaminación en el producto.

Al comparar los datos de prevalencia de la bacteria en invierno, del primer (2.03%) y segundo muestreo (15.38%), se puede observar que hubo una mayor recuperación del microorganismo en el segundo, además de que en este último se logró recuperar cepas de muestras diferentes de quesos. En esta segunda parte se lograron aislar 16 cepas de *Listeria monocytogenes*.

Tercer Muestreo

Una vez que se identificó un rancho con muestras positivas en la cadena de producción, se decidió regresar y tomar muestras, pero esta vez recuperando las cepas con una técnica más sensible, como la descrita por la USDA, la cual indica una recuperación de 1 UFC/g en 25 g de muestra (USDA, 2002). Las muestras y los resultados pueden observarse en la Tabla 6 y Figura 9.

En este último muestreo no se encontraron muestras positivas en el establo, y no existió diferencia ($p > 0.05$) entre lugar de elaboración y mercado, esto confirmó el hecho de que la contaminación proviene únicamente del sitio de procesamiento, debido a la presencia de la bacteria en las superficies que están en contacto con el producto. Esto se ha puesto de manifiesto en otros estudios en los que el microorganismo se ha

encontrado en congeladores, cuartos de procesamiento, drenaje, siendo éste último un nicho importante (Autio, *et al.*, 1999; Zhao, *et al.*, 2004; Robbins *et al.*, 2005).

En este muestreo no se encontraron muestras positivas de queso a pesar de que la técnica empleada es sensible. Esto pudo ocurrir porque la densidad bacteriana en el queso fue menor de 1 UFC/g, que es lo que la técnica permite detectar, y era menor que la encontrada en las superficies. Es importante mencionar que la cantidad de microorganismos transferidos a un alimento depende de propiedades de la biopelícula como son densidad y capacidad de formar exopolisacáridos de la población microbiana, estructura de la biopelícula, así como fuerza de unión de las células microbianas (Midelet y Carpentier; 2002). *L. monocytogenes* tiene una fuerza de unión muy alta y por lo tanto es más difícil de eliminar por operaciones higiénicas comparado con otras bacterias, sin embargo estudios como el de Robbins *et al.* (2005), demuestran que ozono, cloruro y peróxido de hidrógeno fueron eficaces para eliminar biopelículas de este microorganismo así que podrían ser una alternativa para eliminar la contaminación en este tipo de industria.

Otra razón para no encontrar cepas de *L. monocytogenes* pudo ser que esta especie fue enmascarada por otras cepas de *Listeria*. La técnica que se utilizó en esta etapa fue la descrita por la USDA, que permite una mayor recuperación de cepas de *L. monocytogenes*, sin embargo se reporta que aún con medios y técnicas más específicas, algunas cepas de esta especie pueden escapar a la detección. En un estudio realizado por Bruhn *et al.* (2005) se encontró que *L. innocua* puede crecer más rápidamente que *L. monocytogenes* en UVM y otros medios de enriquecimiento. También que cepas de la División I (que incluyen serotipos 1/2b, 4b y 3b) al crecer en UVM junto con *L. innocua*, fueron recuperadas sólo en un 2-6%, mientras que al crecer juntas División I y División II (serotipos 1/2a, 1/2c y 3a) se favorecía el crecimiento de la División I. Otro aspecto importante es que la acriflavina empleada en el UVM inhibe microorganismos Gram positivos diferentes de *L. monocytogenes*, pero se ha encontrado que algunas cepas de esta especie pueden ser inhibidas o bien variar en sensibilidad a este antibiótico (Bruhn *et al.*, 2005).

Tabla 6. Número de muestras tomadas utilizando la técnica de la USDA (USDA, 2002) para la recuperación de cepas de *L. monocytogenes*, para cada uno de los puntos establecidos.

DESCRIPCIÓN	MUESTRAS
Ubre	3
Ensilaje	1
Agua bebedero	1
Leche total	1
Superficie tanque de leche	1
Superficie utensilios manejo cuajo	1
Superficie piso quesería	1
Superficie mandil	1
Superficie pared quesería	1
Agua quesería	1
Lavado manos	1
Recipiente de cuajada (azulejo)	1
Molde de queso	1
Superficie tarja	1
Manta	1
Drenaje	1
Superficie cuarto frío	2
Queso	5
TOTAL	25

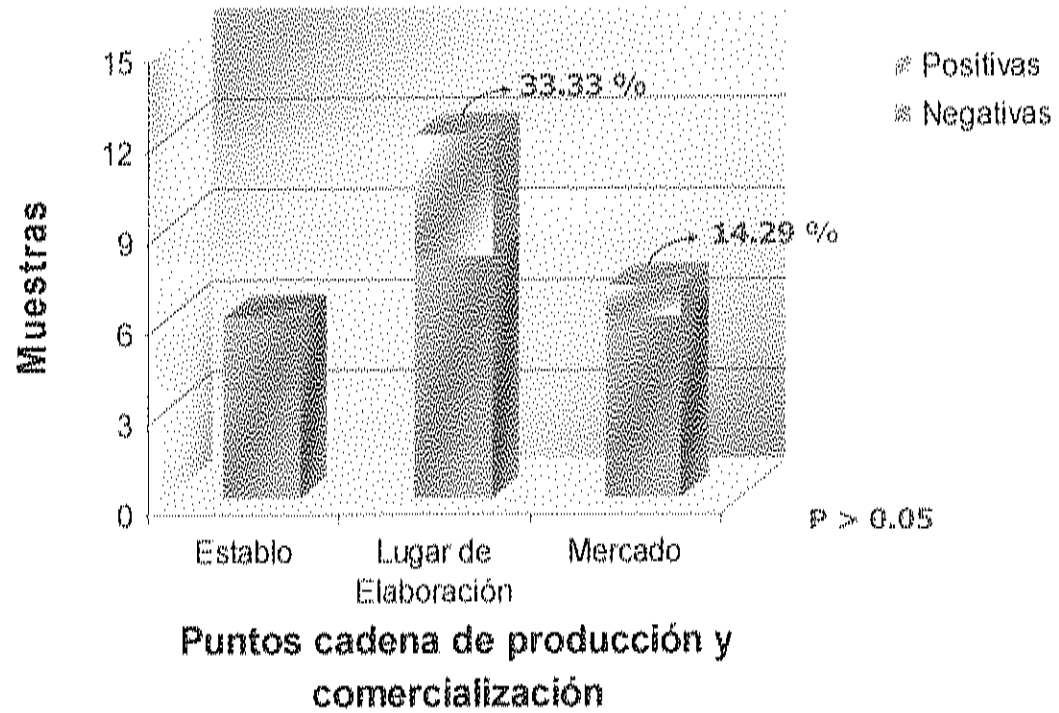


Figura 9. Porcentaje de muestras positivas para *Listeria monocytogenes* del total de muestras tomadas por puntos de la cadena de producción y comercialización, con técnica de recuperación de la USDA (USDA, 2002)

Cultivos de *L. innocua* tienen actividad inhibitoria contra cepas de *L. monocytogenes* porque produce una sustancia del tipo bacteriocina contra este último (Yokoyama *et al.*, 1998), aunque se ha descrito que aislados de la serovariedad 1/2a, como grupo tienden a ser mas resistentes a bacteriocinas antilisteria a 4° C, que el grupo de aislados de serovariedad 4b (Buncic *et al.*, 2001). Por lo tanto la presencia de *L. innocua* no solamente enmascara a *L. monocytogenes*, sino que también puede inhibirla y ésta última escapar a la detección. Pero a pesar de esto se ha documentado que al combinar técnicas como la de la USDA y FDA pueden recuperarse un 90% de muestras positivas de *L. monocytogenes* (Ryser *et al.*, 1996).

En esta etapa se aislaron 12 cepas que junto con las 16 cepas aisladas en la etapa anterior, se caracterizaron mediante ARDRA y PFGE. Por la técnica de ARDRA no se obtuvo diferencia entre las cepas y por lo tanto no se realizó dendrograma de asociación puesto que se observaría una sola línea uniendo a todas las cepas con una similitud de 1.00, los perfiles obtenidos pueden observarse en la Figura 10. Es importante mencionar que en algunos carriles se observa una línea de más de 1000 pb, ésta corresponde a la amplificación del fragmento del gen 16S que es de aproximadamente 1600 pb y es probable que se observe porque la digestión no fue completa.

Por PFGE se obtuvieron 27 perfiles diferentes, los cuales pueden observarse en la Figura 11 junto con el dendrograma de asociación. En el dendrograma puede observarse que la cepa 22, aislada del piso de la quesería, fue diferente del resto, presentando un coeficiente de similitud de 0.37, pero por ARDRA se comprobó que era una cepa de *L. monocytogenes*. El resto de las cepas mostraron coeficientes mayores de 0.6. Se puede destacar que las cepas 13 y 14, provenientes de una muestra de queso, compartieron el mismo perfil. De esta misma muestra se aislaron las cepas 11, 12, 15 y 16, y todas mostraron perfiles diferentes, encontrándose las más alejadas entre si en ramas diferentes, lo que demuestra que en un mismo queso puede existir variabilidad de cepas.

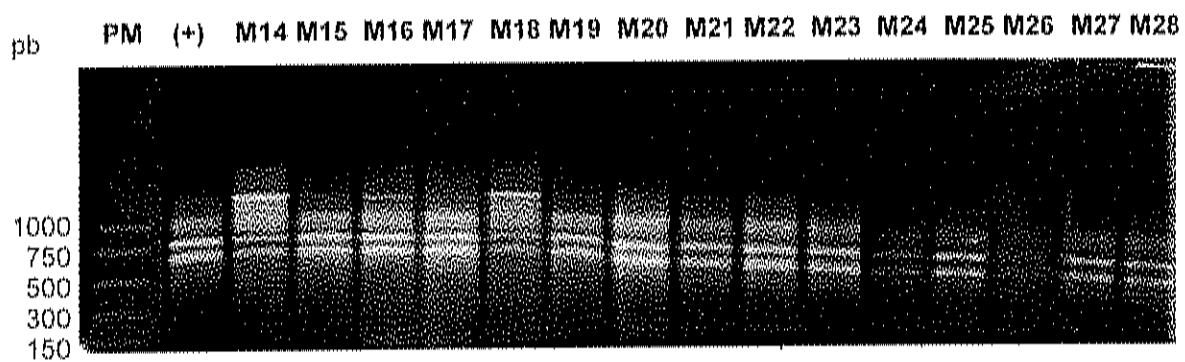
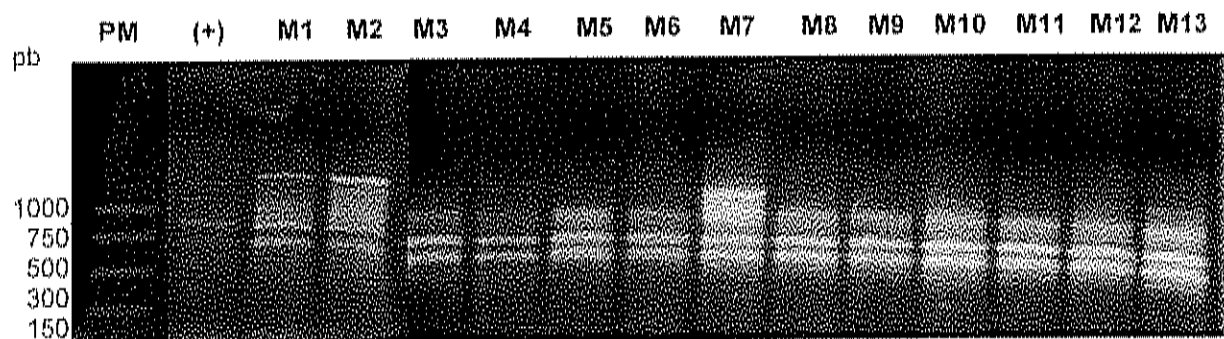


Figura 10 . Perfiles generados por técnica de ARDRA para cepas aisladas en el segundo y tercer Muestreo.

PM = Marcador de Peso Molecular

M1 – M28 = Cepa 1 a Cepa 28

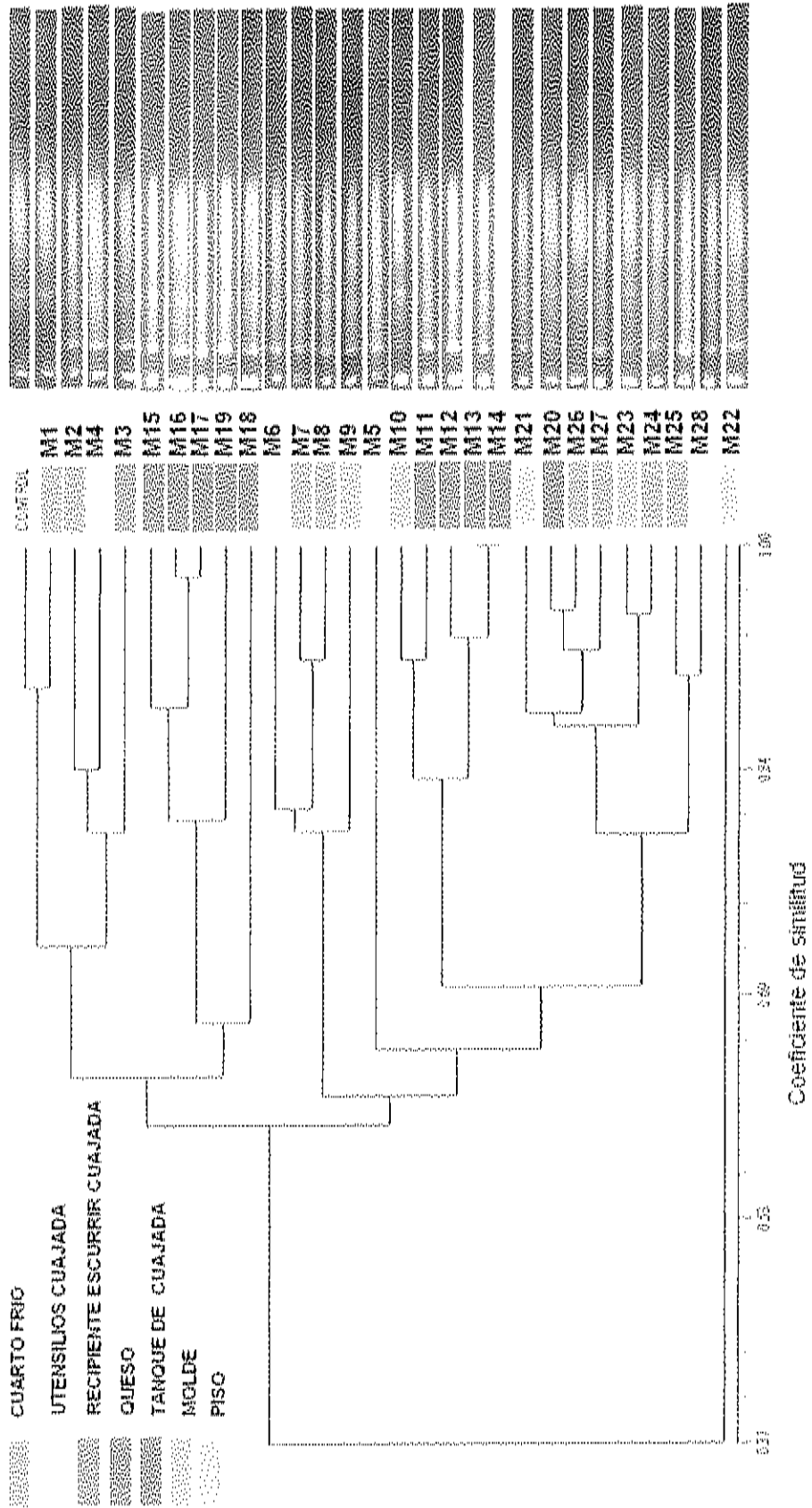


Figura 11. Perfiles generados por técnica de PFGE y coeficientes de similitud obtenidos, a través de dendrograma de asociación, para cepas aisladas en el segundo y tercer muestreo.

M1-M28 = Cepa 1 a Cepa 28

Entre las asociaciones que pueden observarse en el dendrograma están las cepas 16 y 17, aisladas de muestras de queso y del tanque las cepas 10 y 11, aisladas de muestras de molde y de queso, las cepas 20 y 26 aisladas del tanque y del cuarto frío, muestras 23 y 24, aisladas de molde y de cuarto frío y las muestras 25 y 28, aisladas del cuarto frío y de los utensilios. Todas estas cepas mostraron perfiles con un coeficiente de similitud mayor de 0.90, por lo tanto se muestra que el queso se contamina con cepas provenientes de las superficies en el lugar de elaboración. En plantas de pescado ahumado se encontraron perfiles similares entre cepas aisladas del producto terminado y las encontradas en ambiente de procesamiento como agujas de inyección de salmuera y máquina de cortado (Autio *et al.*, 1999; Fønnesbech *et al.*, 2001). En estudios como el de Destro *et al.* (1996) en una planta procesadora de camarón, se encontró que las cajas de plástico utilizadas para transportar el producto, los utensilios de áreas de proceso así como el producto congelado, compartían el mismo perfil molecular y en el trabajo de Berrang *et al.* (2002), en una planta procesadora de pollo crudo y cocido, se encontraron perfiles iguales en drenajes y pisos de áreas de recepción y embarque del producto. El hecho de que se han encontrado los mismos perfiles de cepas aisladas del producto final y los de superficies en el lugar de procesamiento, indica que son éstas las principales fuentes de contaminación en las industrias de alimentos.

En el caso de industrias lácteas, no se tiene mucha información sobre rutas de contaminación con las que se puedan comparar el presente estudio, sin embargo en el trabajo de Waak *et al.* (2002) se encontró que las cepas que contaminaban los silos lecheros, eran muy similares a las presentes en los tanques para transportar la leche y que algunos perfiles de cepas encontradas en los tanques fueron idénticos a los aislados de la leche de la granja y por lo tanto ese era el origen de la contaminación. En el trabajo de Kabuki *et al.* (2004) se analizaron, por ribotipado, cepas de *L. monocytogenes* aisladas de plantas procesadoras de queso fresco y se encontró que el drenaje y los pisos presentaban la mayor contaminación. Además un mismo ribotipo estuvo presente en drenaje, cuarto frío y cajón para transportar y almacenar producto terminado en el cuarto frío, indicando que el cajón era el implicado en la contaminación cruzada en esta empresa.

Por otra parte, es importante mencionar que a las cepas aisladas en los tres muestreos, se les realizó la prueba de serotipificación con antisuero O polivalente para confirmar que pertenecían a la especie *L. monocytogenes*. Sin embargo, para determinar si existe riesgo de brotes epidemiológicos debe realizarse la serotipificación con antisueros monovalentes, tanto para antígeno somático como flagelar, ya que los principales brotes de listeriosis a nivel mundial han sido provocados por los serotipos 1/2a, 1/2b y 4b. De acuerdo a los resultados de las técnicas moleculares, en los quesos y en las superficies existió variabilidad de cepas, por lo tanto también es posible una variabilidad de serotipos y esto implica posibles riesgos de brotes epidemiológicos en el Estado. Así también se propone sugerir mejoras en la limpieza de equipos y superficies en el lugar de procesamiento para eliminar las células de *Listeria monocytogenes* presentes y de esta manera prevenir la contaminación del queso fresco.

CONCLUSIONES

- ✓ Se analizaron 420 muestras por NOM, 381 utilizando un medio de cultivo general para transportar muestras y 39 con un medio de cultivo de enriquecimiento, encontrándose 7 muestras positivas (1.84%) con el primero y 6 con el segundo (15.39%), por lo tanto la selectividad del medio disminuye la competencia con otros microorganismos y aumenta la recuperación de *L. monocytogenes*.
- ✓ Con la técnica de la USDA se analizaron 25 muestras, encontrándose 5 positivas (20.00%), lo que indica que una técnica que implica doble enriquecimiento permite una mejor detección de muestras positivas para *L. monocytogenes*.
- ✓ Al considerar región geográfica, no se encontró diferencia ($p>0.05$) en la recuperación de muestras positivas de *L. monocytogenes*.
- ✓ No hubo diferencia ($p>0.05$) en la recuperación de muestras positivas por época del año.
- ✓ No se encontraron muestras positivas en el establo, únicamente en las superficies en el lugar de procesamiento, en el de comercialización y en quesos, lo que indica que las superficies son probablemente el punto de contaminación del producto.
- ✓ Se aislaron 17 cepas, dos de ellas no hemolíticas, en el primer muestreo, las cuales se caracterizaron por ARDRA y se obtuvieron 2 perfiles, que al analizarse con los 17 perfiles generados por PFGE se observó una tendencia de agrupamiento por época, mas no por región.

- ✓ Se caracterizaron molecularmente 16 cepas recuperadas en el segundo muestreo y 12 del tercero, encontrándose que por ARDRA se produjo un solo perfil y por PFGE, se observaron 27 perfiles diferentes, lo que indica una gran variabilidad molecular en las cepas aisladas tanto en el sitio de elaboración, como en el producto.

- ✓ Se detectó la presencia de *Listeria monocytogenes* en superficies del lugar de procesamiento, cuarto frío para almacenar queso y en queso, esto constituye un riesgo de posibles brotes epidemiológicos.

RECOMENDACIONES

Realizar la serotipificación de las cepas aisladas con sueros monovalentes, para relacionarla con posibles riesgos de listeriosis en el Estado.

Repetir los muestreos con diferentes productores empleando como transporte de muestras un medio selectivo de *Listeria monocytogenes*, así como incrementar el tamaño de muestra para tener una mayor representatividad estadística.

Realizar la técnica de identificación con metodologías más rápidas, sensibles y específicas de *L. monocytogenes*, como PCR para cada uno de los puntos, o utilizar otros medios de cultivo diferenciales para, de esta manera, disminuir el tiempo de análisis y aumentar la recuperación de cepas.

Continuar trabajando con la técnica de Campo Pulsado, para mejorar la resolución de los geles para un análisis más sencillo.

Realizar el análisis molecular con técnicas que tengan mayor discriminación como RAPD o Ribotipado, para que al analizarlas junto con PFGE, se pueda lograr un mejor análisis.

REFERENCIAS

- Acedo-Félix E, Pérez-Martínez G. 2003. Significant differences between *Lactobacillus casei* subsp *casei* ATCC 393 and commonly used plasmid-cured derivative revealed by polyphasic study. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 53:67-75
- Applied Bioestadistics. 1998. NTSyS 2.02pc.
- Autio T, Hielm S, Miettinen M, Sjöberg A, Aarnisalo K, Björkroth J, Mattila-Sandholm T, Korkeala H. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked rainbow trout processing plant detected by Pulsed-Field Gel Electrophoresis typing. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:150-155
- Axelsson F, Sorin M. 1998. *Transia Listeria* Technical Handbook. Disponible en línea. www.diffchamb.com. Acceso febrero 2005.
- Bahk J, Marth EH. 1990. Listeriosis and *Listeria monocytogenes*. In: Cliver DO Ed. *Foodborne Diseases*. Academic Press Inc. San Diego, California. 248-256
- Baxter F, Wright F, Chalmers RM, Low JC, Donachie W. 1993. Characterization by multilocus enzyme electrophoresis of *Listeria monocytogenes* isolates involved in ovine listeriosis outbreaks in Scotland from 1989 to 1991. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:3126-3129
- Benrah N, Sanaa M, Cassin MH, Griffiths MW, Cerf O. 1998. Quantitative risk assessment of human listeriosis from consumption of cheese made from raw milk. *Preventive Veterinary Medicine*. 37:129-145
- Berrang ME, Meinersmann RJ, Northcutt JK, Smith DP. 2002. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry further processing facility and from fully cooked product. *Journal of Food Protection*. 65:1574-1579
- Boerlin P, Bannerman E, Jemmi T, Jacques B. 1996. Subtyping *Listeria monocytogenes* isolated genetically related to the Swiss epidemic clone. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:2148-2153
- Boerlin P, Boerlin-Petzold F, Bannerman E, Bille J, Jemmi T. 1997. Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. *Applied and Environmental Microbiology*. 63:1338-1343
- Bolton LF, Frank JF. 1999. Defining the growth/no-growth interface for *Listeria monocytogenes* in Mexican-style cheese based on salt, pH, and moisture content. *Journal of Food Protection*. 62:601-609

- Bottger EC. 1996. Approaches for identification of microorganisms. *ASM News*. 62: 247-250
- Bordoni P. 2004. *Listeria monocytogenes* outbreak associated with queso fresco. PulseNet Update Meeting.
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:7336-7342
- Brackett RE. 1988. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. *Food Technology*. 162-164
- Bridge P. 1998. Numerical analysis of molecular variability: A comparison of hierarchic and non-hierarchic methods. In: Bridge P, Couteaudier Y, Clarkson JM (eds). *Molecular variability of fungal pathogens*. CAB International. Wallingford, Oxon, UK. pp. 291-308
- Bruhn JB, Fonniesbech VB, Gram L. 2005. Bias in the *Listeria monocytogenes* enrichment procedure: Lineage 2 strains outcompete lineage 1 strains in University of Vermont Selective Enrichments. *Applied and Environmental Microbiology*. 71:961-967
- Buchrieser C, Brosch R, Catimel B, Rocourt J. 1993. Pulsed-field gel electrophoresis applied for comparing *Listeria monocytogenes* strains involved in outbreaks. *Can J Microbiol*. 39:395-401
- Buncic S, Avery SM, Rocourt J, Dimitrijevic M. 2001. Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of *Listeria monocytogenes*? *International Journal of Food Microbiology*. 65:201-212
- Carpenter PL. 1977. *Microbiology*. W. B. Saunders Company. Philadelphia. 4a edition. 135
- CDC. 2001. Outbreak of listeriosis associated with homemade Mexican-style cheese. Disponible en línea. www.cdc.gov/mmur. Acceso diciembre 2003
- CDC. 2002. Public health dispatch: Outbreak of listeriosis- Northeastern United States. Disponible en línea. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5142a3.htm>. Acceso septiembre 2004
- CDC. 2004. What is Pulse Net? Disponible en línea. http://www.cdc.gov/pulsenet/what_is.htm. Acceso septiembre.

- Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine M, Hebraud M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: Surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:728-737
- Chu G. 1990. Pulsed-field gel electrophoresis: Theory and practice. *Methods*. 1:129-142
- Cocolin L, Rantsiou K, Lacumin L, Cantoni C, Comi G. 2002. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:6273-6282
- Czajka J, Bsat N, Piani M, Russ W, Sultana K, Wiedmann M, Whitaker R, Batt CA. 1993. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology*. 59:304-308
- Czajka J, Batt CA. 1994. Verification of causal relationships between *Listeria monocytogenes* isolates implicated in food-borne outbreaks of listeriosis by randomly amplified polymorphic DNA patterns. *Applied and Environmental Microbiology*. 32:1280-1287
- Czuprynski CJ, Faith NG, Steinberg H. 2002. Ability of the *Listeria monocytogenes* strain Scott A to cause systemic infection in mice infected by intragastric route. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2893-2900
- Daniel WW. 1995. *Biostatística. Base para el análisis de las ciencias de la salud*. Noriega Editores. México. pp. 639-642
- De Baere T, De Mendonca R, Claeys G, Verschaerenger G, Mijs W, Verhelst R, Rottiers S, Simaey LV, De Ganck C, Vanechoutte M. 2002. Evaluation of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA) for the identification of cultured mycobacteria in a diagnostic laboratory. *BMC Microbiology*. 2:4. Disponible en línea. <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/2/4>
- Destro MT, Leitão MFF, Farber JM. 1996. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. *Applied and Environmental Microbiology*. 62:705-711
- Díaz-Cinco ME, Armenta R, Fraijo O, Acedo-Félix E, González de Mejía E, Lozano-Taylor J. 1998. Determination of sanitary, chemical quality and amines production in Mexican white soft cheese and Chihuahua style cheese. *Recent Results Development in Nutrition Research*. 2: 59-67
- FAO/WHO. 2003. Norma general del CODEX para el queso. CODEX STAN A-6-1978. Disponible en línea. http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=es

- Farber JM. 1996. An introduction to the hows and whys of molecular typing. *Journal of Food Protection*. 59:1091-1101
- Farber JM, Peterkin PI. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological reviews*. 55:476-511
- Flores LJJ. 2002. Modelo de evaluación de riesgos sanitarios derivados del consumo de agua y alimentos. Dirección de Vigilancia Sanitaria. Secretaría de Salud. México. Disponible en línea. <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y4267M/y4267m07.htm>. Acceso septiembre 2004
- Fonnesbech VB, Huss HH, Ojeniyi B, Ahrens P, Gram L. 2001. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by DNA-based typing methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:2586-2595
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. 1998. *Diagnostic Microbiology*. Mosby Inc. USA. pp. 137
- Fox PF. 1987. Cheese: An overview. En: Fox PF. *Cheese: Chemistry, physics and microbiology*. Vol 1. Elsevier Applied Science. Gran Bretaña. 1-23
- Gallardo V. 29 Noviembre 2004. "Amenaza" Comida extranjera a mexicana. *El Imparcial*. Sección General. 24B-25B
- García AS, Díaz CM, Avilés AM, Mata HV. 2000. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco de Sonora utilizando perlas inmunomagnéticas y Norma Oficial Mexicana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42: 651
- García GA. 2003. Caracterización polifásica parcial de cepas de *Enterococcus sp.* para su utilización como agente probiótico. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Hermosillo Sonora. México. 12, 15-19
- Gianfranceschi M, Pourshaban M, Gattuso A, Wedell-Neergaard, Aureli P. 2002. Characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from food and humans in Italy by pulsed-field gel electrophoresis. *Food Microbiology*. 19:47-55
- Graves LM, Swaminathan B. 2001. PulsedNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*. 65:55-62
- Gudmundsdottir S, Gudbjornsdottir B, Lauzon H, Einarsson H, Kristinsson K, Kristjansson M. 2005. Tracing *Listeria monocytogenes* isolates from cold-smoked salmon and its processing environment in Iceland using pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*. 101:41-51

- Harris LJ, Griffiths MW. 1992. The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction (PCR). *Food Research International*. 25: 457-469
- Harvey J, Gilmour A. 2001. Characterization of recurrent and sporadic *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk and nondairy foods by pulsed-field gel electrophoresis, monocin typing, plasmid profiling, and cadmium and antibiotic resistance determination. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:840-847
- Hintze J. 2000. NCSS 2001 and Pass Trial. Released November 21, 2000.
- Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2004. <http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/estados/son/clim.cfm>. Acceso Noviembre.
- Iñiguez PC. 2002. Detección y prevalencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco por reacción en cadena de la polimerasa y método oficial. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. Hermosillo Sonora. México. 78 págs
- Jacquet C, Catimel B, Brosch R, Buchrieser C, Dehaumont P, Goulet V, Lepoutre A, Veit P, Rocourt J. 1995. Investigations related to the epidemic strain involved in the French listeriosis outbreak in 1992. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:2242-2246
- Johnson EA, Nelson JH, Johnson M. 1990. Microbiological of cheese made from heat-treated milk, part II. *Microbiology Journal of Food Protection*. 53:519-540
- Kabuki DY, Kuaye AY, Wiedmann M, Boor KJ. 2004. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. *Journal of Dairy Science*. 87:2803-2812
- Kozak J, Balmer T, Byrne R, Fisher K. 1996. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. *Food Control*. 7:215-221
- Lagacé L, Pitre M, Jacques M, Roy D. 2004. Identification of the bacterial community of maple sap by using Amplified Ribosomal DNA (rDNA) Restriction Analysis and rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:2052-2060
- Lawrence LM, Gilmour A. 1995. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:2139-2144
- Louie M, Jayaratne P, Luchsinger I, Devenish J, Yao J, Schelch W, Simor A. 1996. Comparison of ribotyping, arbitrarily primed PCR, and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Clinical Microbiology*. 34:15-19

- Lunden J, Tolvanen R, Korkeala H. 2004. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *Journal of Dairy Science*. 87:(E. Suppl.):E6-E11
- McLauchlin J, Mitchell RT, Smerdon WJ, Jewell K. 2004. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiology risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*. 92:15-33
- Mereghetti L, Lanotte P, Savoye-Marczuk V, Marquet-Van Der Mee N, Audurier A, Quentin R. 2002. Combined ribotyping and random multiprimer DNA analysis to probe the population structure of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:2849-2857
- Midelet G, Carpentier B. 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:4015-4024
- Miettinen MK, Siitonen A, Heiskanen P, Haajanen H, Björkroth KJ, Korkeala HJ. 1999. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:2358-2360
- Norton DM, McCamey MA, Gall KL, Scarlett JM, Boor KJ, Wiedmann M. 2001. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:198-205
- Olive M, Bean P. 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organism. *Journal of Clinical Microbiology*. 37: 1661-1669
- Paillard D, Dubois V, Duran R, Nathier F, Guittet C, Caumette P, Quentin C. 2003. Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-Amplified 23S rRNA gene fragments. *Applied and Environmental Microbiology*. 69:6386-6392
- Parrilla CM, Saldate CO. 1990. Procedimiento para el examen microbiológico de superficies y utensilios. *Secretaria de Salud. México*. 9-10
- Perrin M, Bemer M, Delamare C. 2003. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology*. 41:5308-5309
- Pourshaban M, Gianfranceschi M, Gattuso A, Menconi F, Aureli P. 2000. Identification of *Listeria monocytogenes* contamination sources in two fresh sauce production plants by pulsed-field gel electrophoresis. *Food microbiology*. 17:393-400
- Relman DA, Persing DH. 1996. Genotypic methods for microbial identification. En: Persing DH Ed. *PCR protocols for emerging infectious diseases. Supplement to diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. ASM Press. Washington DC. 3-31

- Renner E. 1987. Nutritional aspects of cheese. En: Fox PF. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Vol 1. Elsevier Applied Science. Gran Bretaña. 345-353
- Robbins JB, Christopher WF, Moltz AG, Martin S. 2005. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide. Journal of Food Protection. 68:494-498
- Rocourt J, Cossart P. 1997. *Listeria monocytogenes*. En: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ (Ed). Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. ASM Press. Washington DC. 337-352
- Rodríguez-Lázaro D, Hernández M, Scotti M, Esteve T, Vázquez-Boland JA, Pla M. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and ampliFluor technology. Applied and Environmental Microbiology. 70:1366-1377
- Ryser ET, Arimi SM, Bunduki MM, Donnelly CW. 1996. Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media. Applied and Environmental Microbiology. 62:1781-1787
- Schlegel L, Grimont F, Grimont PAD, Bouvet A. 2003. Identification of major streptococcal species by *rm*-amplified ribosomal DNA restriction analysis. Journal of Clinical Microbiology. 41:657-666
- Seeliger HPR, Hohne K. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergen T, Norris JR (ed). Methods in microbiology. Vol 13. Academic Press. London, England. pp. 31-49
- Shuhaimi M, Ali AM, Norjihan A, Saleh NM, Yazid AM. 2004. Characterisation of *Bifidobacterium* species: A review. Bioscience Microflora. 23:81-92
- SSA, Secretaria de Salud. NOM-143-SSA1-1995. Bienes y Servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*.
- Struelens MJ. 1998. Molecular epidemiologic typing systems of bacterial pathogens: Current Issues and Perspectives. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 93:581-585. Disponible en línea. <http://memorias.ioc.fiocruz.br/935/8mct.html>. Acceso Septiembre 2004.
- Torres LM. 2002. Diseño de un cultivo láctico para la biogeneración del sabor del queso fresco regional. Tesis de Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. México.
- Torres-Llanez MJ, Vallejo-Cordoba B, Diaz-Cinco ME, Mazorra-Manzano MA, Gonzalez-Cordoba AF. 2005. Characterization of the natural microflora of artisanal mexican fresco cheese. Food Control. In Press

- Unnerstad H, Nilsson I, Ericsson H, Danielsson-Tham ML, Bille J, Bannerman E, Tham W. 1999. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 1/2a strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 65:2054-2056
- USDA, United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. 2002. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from red meat, poultry, egg and environmental samples. 21 pags.
- Valencia ME, Hoyos LC, Ballesteros MN, Ortega MI, Palacios MR, Atondo JL. 1998. La dieta en Sonora: Canasta de consumo de alimentos. *Estudios Sociales. Revista de Investigación del Noroeste VIII*: 11-39
- Vanechoutte M, Boerlin P, Hans-Volker T, Bannerman E, Jäger B, Bille J. 1998. Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48:127-139
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, González-Zorn B, Wehland J, Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 14:584-640
- Vela AI, Fernandez-Garayzabal JF, Vazquez JA, Latre MV, Blanco MM, Moreno MA, De la Fuente L, Marco J, Cepeda A, Rodríguez-Moure AA, Suarez G, Domínguez L. 2001. Molecular typing by pulsed-field gel electrophoresis of Spanish animal and human *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:5480-5843
- Waak E, Tham W, Danielsson-Tham ML. 2002. Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and dairy plant receiving tanks. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:3366-3370
- Wagner M, Allerberger F. 2003. Characterization of *Listeria monocytogenes* recovered from 41 cases of sporadic listeriosis in Austria by serotyping and pulsed-field gel electrophoresis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 35: 227-234
- Walstra P, Geurts TJ, Noomen A, Jellema A, Van Boekel MAJS. 1999. *Dairy Technology. Principles of milk properties and processes*. Marcel Dekker, USA. 541-544
- Yokoyama E, Maruyama S, Katsube Y. 1998. Production of bacteriocin-like substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 40:133-137
- Zhao T, Doyle M, Zhao P. 2004. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganism. *Applied and Environmental Microbiology*. 70:3996-4003

ANEXO. MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS

Caldo de Enriquecimiento (EB)

Ingredientes:

Caldo soya tripticasa	30.0 g
Extracto de levadura	6.0 g
Agua	1000.0 mL

Agitar hasta disolver los ingredientes. Esterilizar a 121 °C por 15 min. Una vez frío y antes de su uso, adicionar los siguientes suplementos:

Solución de clorhidrato de acriflavina al 0.5% (p/v)	3.0 mL
---	--------

Solución de ácido nalidíxico al 0.5% (p/v)	8.0 mL
---	--------

Solución de cicloheximida 1.0% (p/v) en sol de 40% etanol/agua (v/v)	5.0 mL
---	--------

Los suplementos se esterilizan por filtración.

Medio de Cloruro de Litio Feniletanol-Moxolactam (LPM)

Ingredientes:

Agar fenil etanol	35.5 g
Glicina anhidra	10.0 g
Cloruro de litio	5.0 g
Agua	1000.0 mL

Calentar a ebullición hasta disolver el agar, esterilizar el medio en autoclave a 121 °C por 15 min. Enfriar de 48 a 50 °C y agregar la siguiente solución previamente esterilizada por filtración:

Solución de moxolactam al 1.0%
en amortiguador de fosfatos pH 6.0 2.0 mL

Medio Oxford (OXA)

Ingredientes:

Base de agar Columbia	39.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Cloruro de litio	15.0 g

Agua	1000.0 mL
------	-----------

Disolver los ingredientes en el agua y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave 10 min a 121 °C. Enfriar a 50 °C y agregar 10 mL de una solución de los siguientes suplementos en etanol/agua (1:1):

Cicloheximida	400 mg
---------------	--------

Sulfato de colistina	20 mg
----------------------	-------

Acriflavina	5 mg
-------------	------

Cefotetán	2 mg
-----------	------

Fosfomicina	10 mg
-------------	-------

Agar Soya Trypticasa con 0.6% de extracto de levadura (ASTEL)

Ingredientes:

Agar soya tripticasa	40.0 g
----------------------	--------

Extracto de levadura	6.0 g
----------------------	-------

Agua	1000.0 mL
------	-----------

Agitar y calentar a ebullición hasta disolver el agar. Esterilizar a 121 °C durante 15 min.

Medio de la Universidad de Vermont (UVM)

Ingredientes:

Peptona proteasa	5.0 g
Triptona	5.0 g
Polvo "Lab-Lemco"	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Cloruro de sodio	20.0 g
Fosfato ácido disódico	12.0 g
Fosfato diácido de potasio	1.35 g
Esculina	1.0 g
Agua	1000.0 mL

Mezclar los ingredientes hasta disolución, esterilizar 15 a 121 °C. Enfriar a 50 °C y agregar 4 mL de una solución que contiene los siguientes suplementos:

Ácido nalidíxico	20 mg
Clorhidrato de acriflavina	12 mg

Medio Fraser

Ingredientes:

Peptona proteasa	5.0 g
Caseina hidrolizada	5.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Cloruro de Sodio	20.0 g
Fosfato ácido disódico	12.0 g
Fosfato diácido de potasio	1.35 g
Esculina	1.0 g
Citrato amónico de hierro	0.5 g
Agua	1000.0 mL

Mezclar los ingredientes hasta disolución, esterilizar 15 a 121 °C. Enfriar a 50 °C y agregar 10 mL de una solución, en NaOH 0.2N, que contiene los siguientes suplementos:

Ácido nalidixico	100 mg
Clorhidrato de acriflavina	250 mg

Medio Oxford Modificado (MOX)

Ingredientes:

Base de agar Columbia	39.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Cloruro de litio	15.0 g
Agua	1000.0 mL

Disolver los ingredientes en el agua y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave 15 min a 121 °C. Enfriar a 50 °C y agregar 10 mL de una solución de los siguientes suplementos en agua purificada estéril.

Sulfato de colistina	10 mg
Moxolactam	20 mg

Medio Oxford Modificado (MOX)

Ingredientes:

Base de agar Columbia	39.0 g
Esculina	1.0 g
Citrato férrico amónico	0.5 g
Cloruro de litio	15.0 g
Agua	1000.0 mL

Disolver los ingredientes en el agua y llevar a ebullición hasta disolución completa. Esterilizar en autoclave 15 min a 121 °C. Enfriar a 50 °C y agregar 10 mL de una solución de los siguientes suplementos en agua purificada estéril.

Sulfato de colistina	10 mg
Moxolactam	20 mg