

Centro de Investigación en Alimentación
Y Desarrollo A.C.

Detección y Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en Queso
Fresco por Reacción en Cadena de la Polimerasa y Método Oficial

Por

Claudia María Iñiguez Palomares

Tesis aprobada por la

DIRECCIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como Requisito Parcial para Obtener
El Grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

SEPTIEMBRE DEL 2002

Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.

Detección y Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en Queso Fresco por reacción en
cadena de la Polimerasa y Método Oficial

Por

Claudia María Iñiguez Palomares

Tesis Aprobada por la

DIRECCIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

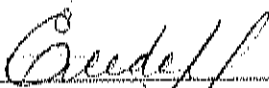
Septiembre del 2002

APROBACIÓN

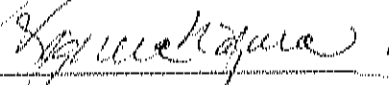
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Claudia María Iñiguez Palomares, han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias con especialidad en Nutrición y Alimentos.



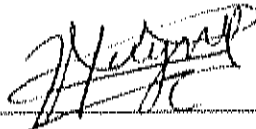
Dra. Martha E. Díaz Cinco
Directora de Tesis



Dra. Evelyn Acedo Félix



Dr. Inocencio Higuera C.

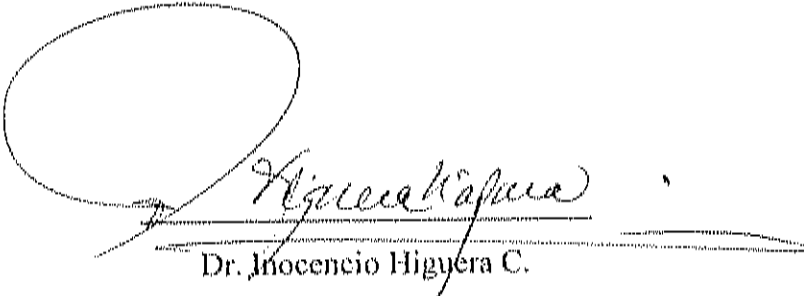


M.C. Humberto González R.

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, consultas o la reproducción íntegra del documento para fines académicos. En otras circunstancias, se deberá solicitar permiso del autor.



Dr. Inocencio Higuera C.
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero brindado durante mis estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C. por todo el apoyo recibido para realizar este trabajo.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP), en especial a Magaly Avilés, Marisela Ramírez y Rossy Cavardillo, por las facilidades otorgadas para obtener las muestras de todo el estado.

A todo el comité de tesis, Dra. Martha Díaz, Dra. Evelia Acedo, Dr. Inocencio Higuera y M.C. Humberto González, por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo.

Gracias Evelia, por tu amistad, tiempo y paciencia.

DEDICATORIA

A DIOS, por darme la oportunidad de realizar todos mis sueños GRACIAS.

A MIS PADRES, Ramón y Magda Irma, por darme la oportunidad de vivir y por su apoyo incondicional en todo lo que emprendo LOS QUIERO MUCHO.

A Magda, Agustín, Ramón y Ericka (todos son mis hermanos), por su apoyo y consejos oportunos.

A cinco niños maravillosos que alegran mi vida: Agustín, Felipe, Daniel, Alejandro y Alejandra.

A todos los que me ayudaron e hicieron agrdable mi estancia en el laboratorio de Microbiología: Ame, Rocío, Yola, Frank, Vero C., Miguel, Poncho, Lucía, Vero M., Rosalva P. y Eva.

A mis compañeros de Maestría: Luz Ma., Saúl, René, Iliana, Tania, Lyssia, Enrique, Jorge, Sayda, Katia, Felipe, Haidé y Ricardo, por los buenos momentos.

A Iliana, Jorge y Tania, por compartir parte de su vida conmigo.

A la familia Uribe Ruelas, por ser como una segunda familia para mí.

A las familias Pérez Palomares, Silva Palomares y Sra. Lolita, por su apoyo y compañía durante mi estancia en Hermosillo.

A todas aquellas personas que omito y que directa o indirectamente hicieron posible este trabajo.

A TODOS, MUCHAS GRACIAS

CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN	v
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
Queso Fresco	4
Consumo en Sonora	5
Elaboración	5
Composición Fisicoquímica	6
Grasa	6
Proteínas	7
Carbohidratos	7
Vitaminas	7
Minerales	7
Actividad de agua (Aw)	8
pH	8
Calidad Microbiológica	8
<i>Listeria monocytogenes</i>	9
Antecedentes Históricos	10
Perfil Bioquímico	11
Perfil Serológico	13
Reservorios y Rutas de Transmisión	15
Patogénesis	18
Listeriosis y Poblaciones Susceptibles	20
Brotos de Listeriosis	22
Alimentos Implicados	24
Métodos de Detección en Alimentos	27

CONTENIDO (continuación)

	Página
Factores de virulencia expresados por <i>L. monocytogenes</i>	29
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	30
Selección de los iniciadores	33
Ventajas y Desventajas	34
Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR en Quesos	35
MATERIALES Y MÉTODOS	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
CONCLUSIONES	64
RECOMENDACIONES	66
REFERENCIAS	67

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Diferenciación bioquímica de las especies de <i>Listeria</i>	14
2.	Factores de virulencia expresados por <i>Listeria monocytogenes</i>	31
3.	Condiciones programadas en el termociclador para amplificar un fragmento de ADN de 520 pb del gen <i>hlyA</i> , utilizando los iniciadores LL1 y LL2	41
4.	Promedios de recuperación de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco inoculando diferentes concentraciones en leche	46
5.	Incidencia de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco por municipio	57
6.	Porcentajes de muestras positivas por técnica oficial y por PCR	58
7.	Especies de <i>Listeria</i> aisladas de queso fresco del estado de Sonora	62

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página	
1.	Características celulares y fenotípicas de <i>Listeria monocytogenes</i> a) Bacilo corto gram positivo b) Desarrollo de flagelos a 25° C c) Hemólisis en Agar Sangre	12
2.	Posibles rutas de transmisión de <i>Listeria monocytogenes</i>	17
3.	Amplificación <i>in vitro</i> de un fragmento de ADN (PCR)	32
4.	Recuperación de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco por el método de cuenta directa en Agar Oxford	45
5.	Amplificación por PCR de ADN de cultivos puros	51
6.	Detección por PCR de diferentes concentraciones de <i>Listeria monocytogenes</i> en queso fresco	55
7.	Muestras de queso fresco con reacción de PCR positiva para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> , obtenidas de varios municipios del Estado de Sonora	60

RESUMEN

Listeria monocytogenes es un patógeno bacteriano que se encuentra de manera generalizada en diferentes hábitats. Su importancia radica en la relación que existe con diversos casos aislados y brotes de listeriosis ocurridos a nivel mundial por el consumo de alimentos que permiten el crecimiento de la bacteria, como los productos lácteos. La amplia prevalencia del microorganismo en el sistema alimentario, junto con la alta mortalidad de la infección, indican que esta bacteria representa un peligro para la salud pública. En Latinoamérica existe preferencia por el consumo de queso fresco y teniendo en cuenta que se elabora con leche cruda, aunado a la ubicuidad de *L. monocytogenes*, es factible su presencia en este producto.

La concentración de *L. monocytogenes* en alimentos generalmente es $\leq 10^3$ UFC/g, salvo excepciones como la ocurrida en Illinois, E.U. En México, la detección de la bacteria, se realiza siguiendo el procedimiento propuesto por la técnica oficial (NOM-143-SSA1-1995). Ésta se basa en realizar un preenriquecimiento selectivo de la muestra para aumentar la población del microorganismo, seguido del aislamiento de las colonias sospechosas en medios de cultivo selectivos y diferenciales. El procedimiento es laborioso y tardado. Debido a ello la demanda por un método rápido, sensible y confiable ha aumentado. La utilización de técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), simplifican y acortan el tiempo de análisis. La mayoría de los estudios se han realizado en alimentos contaminados artificialmente, por lo que el objetivo de este trabajo fue detectar y evaluar la prevalencia de *L. monocytogenes* por PCR en queso fresco contaminado naturalmente.

Se elaboraron quesos frescos utilizando leche cruda contaminada con *Listeria monocytogenes* en concentraciones desde 12×10^1 hasta 12×10^5 UFC/ mL. Se realizó cuenta en placa con agar Oxford para determinar el porcentaje de recuperación. De la

concentración menor se recuperó el 43% ($p < 0.05$) de las bacterias, mientras que de la mayor se recuperó el 11% ($p < 0.05$). Estos mismos quesos se utilizaron para determinar la sensibilidad de la técnica de PCR. Se encontró que al realizar lisis rápida directamente de la muestra la concentración menor analizada, con resultados positivos fue 52 UFC/g. Una vez establecida la sensibilidad se analizaron quesos frescos de diferentes municipios del estado de Sonora. Los procedimientos de detección fueron la técnica propuesta por la NOM-143-SSA1-1995 (cultivo *in vitro*) y la PCR (procedimiento molecular). De 101 muestras, 10 resultaron positivas por la NOM mientras que 23 lo fueron por PCR. Esta última mostró mayor sensibilidad ($p < 0.05$) para detectar *L. monocytogenes* con 22.7 % de positividad contra el 9.9 % de la técnica oficial. Lo anterior indica que el queso fresco elaborado con leche sin pasteurizar, representa un riesgo potencial para la salud pública.

INTRODUCCIÓN

El queso es un importante derivado de la leche, con alto valor nutritivo, rico en proteínas y calcio, pero sobre todo, de exquisito sabor. Se produce mundialmente y los procesos de elaboración varían de una región a otra por lo que existen al menos 500 tipos diferentes en el mundo, para los múltiples gustos del consumidor, tanto en sabor como en precio (Kosikowski, 1982).

En México y América Latina existe preferencia por el consumo de queso fresco, ya que por sus características económicas y organolépticas se adapta a diferentes hábitos alimenticios, representando una fuente de proteínas relativamente barata, en comparación con la carne. Sin embargo la elaboración a partir de leche sin pasteurizar siguiendo esquemas artesanales, propicia que su consumo sea un riesgo para la salud pública. Las condiciones antihigiénicas con que se produce pueden convertirlo en un vehículo para la transmisión de patógenos como *Listeria monocytogenes*, bacteria a la que se le ha relacionado con brotes de listeriosis por el consumo de este alimento (Huerta, 1999).

La listeriosis en los seres humanos se presenta principalmente como septicemia, meningitis, abortos e infección materno-fetal. Estos padecimientos tienen una tasa de mortalidad del 20 – 30% (Codex Alimentarius, 2001). En los últimos años se han presentado casos con síntomas menos graves como la gastroenteritis con diarrea poco severa (Dalton y col., 1997, Schlech, 1997). Una forma de prevenir esta infección es con la correcta y rápida detección de *Listeria monocytogenes* en alimentos. La técnica tradicional (NOM-143-SSA1-1995) se basa en realizar un preenriquecimiento selectivo de la muestra para aumentar la población del microorganismo, seguido del aislamiento de las colonias sospechosas en medios de cultivo selectivos y diferenciales. Con éstas se realizan las pruebas de identificación bioquímicas y serológicas correspondientes. El procedimiento tarda de 3 a 4 días en dar un resultado negativo y de existir colonias

sospechosas en los medios selectivos, puede requerir hasta 13 días para identificar la especie y dar un resultado confirmativo, por lo que el desarrollo de técnicas que acorten el tiempo no se ha hecho esperar (NOM, 1995; Oteo y Alós, 2000).

Entre los métodos de detección alternos se encuentran los inmunológicos (ELISA, perlas inmunomagnéticas, anticuerpos monoclonales) y los que se basan en el análisis de ácido desoxirribonucleico (ADN). La aceptación de los procedimientos inmunológicos se hace con reservas dado que en ocasiones sólo identifican al género y no a la especie, lo que obliga a una confirmación bioquímica y serológica posterior. Además las muestras requieren del paso de preenriquecimiento para obtener suficiente densidad celular ($10^5 - 10^6$ células/g) y dar un resultado positivo (Swaminathan, 1994).

Actualmente la atención se ha enfocado en los métodos de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica amplifica una secuencia específica del ADN de la bacteria, que puede estar presente en baja concentración. Se ha utilizado para detectar patógenos en alimentos de una manera rápida y precisa (Soo Ha y col., 2002), pero la mayor parte de los estudios se han realizado en muestras preenriquecidas y/o contaminadas artificialmente. Es de vital importancia una evaluación con alimentos naturalmente contaminados, para lo cual, en este trabajo se propusieron los siguientes objetivos:

OBJETIVOS

Objetivo General

Detectar y evaluar la prevalencia de *Listeria monocytogenes* por el método de PCR y el de la norma oficial en queso fresco de Sonora, contaminado naturalmente.

Objetivos Específicos

- Evaluar la recuperación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco regional.
- Estandarizar la técnica de PCR para detectar *Listeria monocytogenes* en queso fresco regional.
- Evaluar la sensibilidad de la PCR y compararla con la del método de la Norma Oficial (NOM-143-SSA1-1995).

ANTECEDENTES

Queso Fresco

El queso es un alimento derivado de la leche, con alto valor nutritivo, rico en proteínas y calcio, pero sobre todo, de exquisito sabor. Se empezó a consumir en Asia miles de años A. C. y algunos manuscritos de la antigüedad contienen referencias sobre su elaboración como una manera de conservar la leche cruda en épocas de rendimiento excesivo. Actualmente existen diferentes tipos, de acuerdo al lugar de origen o método de fabricación. Por tal motivo, hay cientos de variedades clasificadas de acuerdo a la forma, aspecto, color, sabor y consistencia como el queso de pasta dura y semidura, queso de pasta blanda, queso fresco y queso fundido por mencionar algunos (Kosikowski, 1982; Altekruze y col., 1998; Díaz y col., 1998a).

En México y América Latina, el queso fresco es un alimento popular por su proceso de elaboración simple y sabor relativamente neutro que se adapta a diferentes hábitos alimenticios (Arizpe y Westhoff, 1984). En el sur y oeste de Estados Unidos, también es popular debido a la significativa población hispana. Su elaboración a partir de leche cruda siguiendo esquemas artesanales, propicia que el consumo sea un riesgo para la salud por el alto grado de contaminación microbiana. Dado que es un producto de contenido energético elevado y sin maduración previa al consumo, constituye un medio ideal para el crecimiento de diversos patógenos provenientes de la leche o adquiridos durante y después de la elaboración del queso, a causa de las malas prácticas de higiene. En los países desarrollados no está permitida la venta de queso frescos que no cumplan con al menos 60 días de maduración, ya que la acidez producida durante este periodo es letal para la mayoría de las bacterias patógenas (Kozak, 1996).

En México la norma oficial NOM-121-SSA1-1994 establece que el queso fresco se debe elaborar con leche estandarizada y pasteurizada sin embargo, los productores

pocas veces cumplen esta disposición y es común que los animales de donde proviene estén enfermos (sintomáticos y asintomáticos). Así mismo, durante la distribución y en los lugares de venta al público la temperatura de almacenamiento del producto final, en la mayoría de los casos no se controla, favoreciendo la proliferación de los gérmenes presentes. Con frecuencia ha sido causa de brotes tóxicos – infecciosos (Huerta, 1999).

Consumo en Sonora

En países como Francia, Italia, Israel y Estados Unidos el consumo de queso oscila de 10 a 17.8 kg per cápita al año. Si se comparan estos datos, en México el consumo es bajo, con 5 kg per cápita anuales hasta el año de 1987 (Acedo, 1994). De acuerdo a datos más recientes proporcionados por la FAO (1994), México se colocó como el segundo productor de queso en América Latina con 116, 360 toneladas, siendo superado sólo por Argentina (Fox y McSweeney, 1998). A nivel nacional su consumo aumentó 4.7% de 1996 a 1999. En ese mismo año, 28.6% de la producción lechera nacional se destinó a la fabricación de productos lácteos elaborados con leche cruda (CEA, 1999). Existen en el país más de 1300 establecimientos que producen queso, principalmente fresco, sin embargo la mayoría son pequeñas empresas de carácter artesanal donde la materia prima principal es leche sin pasteurizar (FIRA, 2001).

Sonora es un estado tradicionalmente ganadero por lo que los derivados lácteos como el queso, son populares. Independientemente de la forma de consumo el queso fresco se ingiere en un promedio de 4.6 kg anuales per cápita. Ocupa el 16vo lugar de los alimentos más consumidos. Junto con la carne, huevo, leche y pescado, es uno de los principales aportadores de proteína en la dieta del sonorense y también es fuente importante de calcio (Valencia y col., 1998).

Elaboración

El proceso de elaboración del queso fresco en Sonora, generalmente se rige por técnicas artesanales. La leche con que se elabora no se pasteuriza y se mantiene a temperatura ambiente desde el lugar de ordeña hasta el sitio donde se procesa. Al llegar

a su destino, la leche se coagula con renina en forma directa a razón de 1 volumen por cada 200 volúmenes de leche. Se agita manualmente y se deja reposar durante 2 horas. Transcurrido el tiempo se corta la cuajada y se deja reposar 15 minutos para separarla del suero, el cual se decanta. El resto se separa por filtración en una manta ejerciendo presión suave para evitar pérdida de cuajada. Ésta se muele, se sala al gusto y se moldea empleando una piedra como prensa, donde permanece de 2 a 3 horas dependiendo de lo seco que se desee el queso. En este último paso, también hay pérdida de suero, pero en menor cantidad. El producto final no se somete a ningún proceso de maduración, por lo que inmediatamente concluido el proceso está listo para su distribución y consumo.

El queso fresco, elaborado de manera artesanal, no está sujeto a control de calidad, como en el caso de la producción industrial. La seguridad para la salud del consumidor depende únicamente de la higiene de la leche y del procesamiento (Díaz y col., 1998a).

Composición fisicoquímica

La forma en que se obtiene y corta la cuajada junto con el grado de desuerado afectan su composición, principalmente en el contenido acuoso. La pérdida de agua que acompaña a la fabricación del queso concentra los principales nutrientes de la leche. Los quesos frescos tienen alto contenido de humedad y pH cercano a la neutralidad, convirtiéndose en un medio ideal para el desarrollo de microorganismos.

Grasa. La mayor parte de la grasa precipita dentro de la cuajada. La cantidad mínima señalada por la Ley General de Salud en México es del 20% (Diario Oficial de la Federación, 1988). En un estudio realizado en la ciudad de Hermosillo se encontró que el queso fresco expuesto al público contiene 19.16% (Díaz y col. 1998b). La grasa de este alimento es similar a la de la leche. Contiene 60% de ácidos grasos saturados y 40% de ácidos grasos insaturados. El contenido de colesterol es bajo comparado con otros quesos semimadurados o madurados (0-100 mg/100g), pero aporta más que la carne de vacuno (Robinson y Wilbey, 1998).

Proteínas. La importancia nutricional de los quesos está en su alto contenido de proteínas biológicamente disponibles, que varía en forma inversa a la grasa. La caseína es la principal proteína de la leche. Representa el 75 – 80% del total de las proteínas y se transfiere en un 95% al queso. Su valor biológico no se afecta por la acción de la renina durante la formación de la cuajada (Robinson y Wilbey, 1998). En México el contenido mínimo de proteína indicado en la Ley General de Salud es del 18%. El queso fresco expendido en Hermosillo promedia 17.1, muy cercano al estándar (Diario Oficial de la Federación, 1988; Díaz y col., 1998b).

Carbohidratos. La lactosa (principal carbohidrato de la leche) no es responsable de un aporte significativo de energía pues se encuentra en concentraciones muy bajas (1-3g/100g). La mayor parte se va en el suero y la porción que permanece es convertida parcialmente a ácido láctico, favoreciendo ligeramente el aprovechamiento de calcio por nuestro organismo (Robinson y Wilbey, 1998).

Vitaminas. La cantidad de vitaminas liposolubles de la leche depende de su contenido de grasa. La vitamina A es la que está presente en mayor proporción y por ser liposoluble, aproximadamente el 80 – 85% pasa al queso. Los valores de tiamina, ácido nicotínico, ácido fólico y ácido ascórbico que se conservan en el queso son del 10 – 20%, para riboflavina y biotina 20 – 30%, para piridoxina y ácido pantoténico 25 – 45% y para cobalamina 30 – 60%. El resto son vitaminas hidrosolubles que se desechan en el suero (Fox, 1987; Robinson y Wilbey, 1998).

Minerales. En la leche está presente una gran variedad de minerales, siendo el calcio y fósforo los más importantes. Cuando es convertida en queso aumentan el valor nutritivo de este producto y permiten que la cuajada se separe del suero al propiciar que precipite por la formación de micelas de caseína (Robinson y Wilbey, 1998). Los quesos coagulados por acción enzimática (renina) tienen mayor concentración de calcio que los elaborados por acidificación de la leche. El contenido de otros minerales (g/kg) varía con el tipo de queso pudiéndose encontrar sodio en 0.3 – 18.5; potasio, 0.5 – 3.8 y magnesio, 0.1 – 0.7. La variación tan grande de sodio se debe a la cantidad de sal que se agrega a los quesos durante la fabricación (Fox, 1987).

Actividad de agua (Aw). Una de las principales características del queso fresco es su alto contenido de humedad ($>50\%$). Ya que no recibe ningún proceso de maduración, su actividad de agua es elevada (0.96 - 0.97). Esto lo hace un producto perecedero a causa de la descomposición microbiana si no es mantenido en refrigeración (Robinson y Wilbey, 1998).

pH. Es un parámetro variable. En los quesos que se consumen inmediatamente después de elaborados el pH es de 6 aproximadamente. En los quesos que reciben un proceso de maduración es menos probable la presencia de bacterias patógenas, debido al descenso inicial de pH hasta valores de 4.5, causado por la producción de ácido láctico. Posteriormente se alcanza un pH de 7.5 debido al proceso de proteólisis.

La Ley General de Salud en México establece un pH de 5.3, condición que pocas veces se cumple en los productos elaborados siguiendo un proceso artesanal. El queso fresco expendido en Hermosillo, por no tener un período de maduración alcanza pH de 6.14 (Walstra y col., 1999; Diario Oficial de la Federación, 1988; Díaz y col., 1998b).

Calidad Microbiológica

Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto el peligro que representa para la salud consumir leche cruda y sus derivados. En Estados Unidos y Canadá varias de las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos han sido ocasionadas por quesos elaborados a partir de leche sin pasteurizar, contaminados con diferentes microorganismos (*Salmonella* sp, *E. coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes*, entre otros) (IFST, 1998). Estudios realizados en Guatemala, Venezuela, Brasil y México demuestran las condiciones precarias de higiene de elaboración del queso fresco en la mayoría de los países de América Latina, con altos índices de contaminación fecal y *Staphylococcus aureus*. Esto indica que también pueden estar presentes otras bacterias patógenas. Otros estudios ponen de manifiesto que la gran mayoría de los quesos artesanales no cumplen con las normas establecidas en relación a la carga de microorganismos (De León y col., 1996; Díaz y col., 1998a; Delgado da Silva y col., 1998; Citti y col., 1999).

En Sonora, la mayoría de los productores, practican un control de calidad empírico durante la elaboración del queso fresco. Éste se basa en las características sensoriales (sabor, olor, color y consistencia) de la leche. El problema de la de higiene durante la ordeña y manipulación de la materia prima también incide en la calidad del producto terminado. Diversos estudios microbiológicos, hacen evidente la pobre calidad sanitaria de este producto. En el municipio de Hermosillo se han detectado coliformes totales y fecales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en un número más elevado de lo permitido por la Ley General de Salud. Además, se encontraron patógenos como *Salmonella* y *Shigella*, que son causantes de enfermedades gastrointestinales e intoxicaciones alimentarias (Díaz y col., 1998b). En el 15% de las muestras de leche cruda y el 7.5% de los quesos de Guaymas y Cajeme se aisló *Brucella* sp. (Accedo y col., 1997). También, a nivel estatal se encontró una incidencia del 4% de *Listeria monocytogenes*, microorganismo que en estudios anteriores no se había detectado (García y col., 2000). La contaminación de la leche con microorganismos patógenos puede provenir de animales que presentan un cuadro subclínico de mastitis donde los síntomas no pueden ser advertidos de forma visual o al tacto y el agente etiológico es desechado en el líquido durante la ordeña.

Todas las investigaciones anteriores indican que un queso elaborado con las características particulares del queso fresco de Sonora, expone a los consumidores a toxi – infecciones. La falta de financiamiento y de acceso a mejoras tecnológicas son causa de que el equipo utilizado para la fabricación no sea el adecuado. Se hace indispensable mejorar las condiciones sanitarias de los quesos artesanales, de una forma adaptada al medio del productor, desde la ordeña hasta llegar al producto final.

Listeria monocytogenes

En el queso fresco pueden estar presentes una gran diversidad de microorganismos, debido a su composición fisicoquímica. Los patógenos como *E. coli*, *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, *Brucella* sp., *Coxiella burnetti*,

Listeria monocytogenes y otros satisfacen sus requerimientos nutricios en este tipo de alimento. Además las condiciones de higiene con que se fabrica y almacena el queso permiten su desarrollo. Algunos quesos madurados no favorecen la presencia de microorganismos patógenos debido a la acidificación y posterior aumento de pH que sucede durante este proceso. Sin embargo *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir a estas condiciones adversas para seguir desarrollándose en concentraciones de hasta 10^8 UFC/g durante el tiempo de añejamiento (Brackett, 1988).

En 1926 se descubrió a *Listeria monocytogenes* como un germen patógeno en conejos jóvenes. Años después fue aislada de humanos y se estableció la transmisión humano - animal (zoonosis). Sin embargo, su asociación con alimentos permaneció como un misterio hasta principios de 1980 cuando el número de aislados clínicos de *Listeria* se incrementó y en 1983 brotes epidémicos en Estados Unidos y Europa revelaron claramente esta forma de transmisión. La bacteria representa una nueva generación de patógenos transmitidos por alimentos (Gellin y col., 1989; Farber y Peterkin, 1991).

Antecedentes Históricos

Antes de que iniciara el siglo XX, investigadores de Francia y Alemania notaron la presencia de bacilos gram positivos en el tejido de individuos que probablemente tenían listeriosis, pero entonces no se conocía la enfermedad. En los años subsiguientes, la bacteria fue aislada y nombrada por diversos investigadores. En 1919, Hulphers asignó el nombre de *Bacillus hepatis* a un microorganismo que identificó en el tejido necrosado del hígado de un conejo. En ese mismo año, clínicos franceses aislaron una bacteria "difteroide" del fluido espinal de un paciente con meningitis. En 1923, su descripción sin ambigüedades la realizó Murray y col. En 1924, se llamó *Bacterium monocytogenes*, a un microorganismo productor de monocitosis en conejos. En 1925 se nombró *Listerella hepatolytica* a un germen epizoótico en ratones del sur de África. En 1929, Nyfeldt aisló al agente etiológico de la mononucleosis infecciosa y lo llamó *Bacterium monocytogenes hominis*. Fue hasta 1940 que el microorganismo se nombró

Listeria monocytogenes. Desde la década de 1960 se le ha relacionado con infecciones en humanos y animales. Es en la década de 1980 que se reconoce su transmisión por alimentos, principalmente por el consumo de productos lácteos no pasteurizados. Debido a esto, en la actualidad se le reconoce como patógeno emergente. Es el agente etiológico del 98% de los casos de listeriosis que se dan en personas y del 85% de los que se presentan en animales.

Las características que hacen a *L. monocytogenes* de especial interés es su habilidad para proliferar a temperaturas de refrigeración o en condiciones de escaso oxígeno, es resistente a diversas condiciones ambientales como alto contenido de sal o acidez elevada. Puede sobrevivir durante largos períodos en el ambiente, en los alimentos congelados o desecados, en las plantas elaboradoras y en el refrigerador doméstico. Incluso, si al inicio está presente en niveles bajos en un alimento, el microorganismo puede multiplicarse durante el almacenamiento cuando el producto favorece su proliferación (Gellin y col., 1989; Farber y Peterkin, 1991; Pinner y col., 1992).

Perfil Bioquímico

Los géneros *Brochontrix*, *Erysiphelothrix*, *Lactobacillus* y *Kurthia* tienen características bioquímicas y serológicas semejantes a las de *Listeria*. También se han aislado de carne, productos cárnicos, lácteos y otros tipos de alimentos. En consecuencia las pruebas de movilidad, crecimiento anaerobio, producción de catalasa, temperatura de crecimiento y producción de ácido a partir de glucosa, son críticas para la clasificación inicial del género *Listeria*.

Todas las especies de *Listeria* son bacilos cortos (0.4 por 1 a 1.5 μm), Gram positivos, no esporulados, carecen de cápsula y son anaerobios facultativos (Figura 1a). El rango de temperatura en el que se desarrollan varía de 2 a 42° C y el pH es de 4.5 a 9.8 con actividad de agua por arriba de 0.92 (Figura 1b). Desarrollan flagelos peritricos, lo cual les da una movilidad característica en forma de tumbos, que se presentan sólo entre los 20 y 28° C, mientras que a 37° C los pierde, son catalasa positiva y oxidasa

negativa. La caracterización a nivel de especies se basa en la actividad hemolítica sobre agar sangre (Figura 1c), en la prueba de CAMP (hemólisis sinérgica con *Staphylococcus aureus* y con *Rhodococcus equi*) y la fermentación de carbohidratos (Cuadro 1). Tres de las seis especies producen hemólisis, *L. monocytogenes* expresa una hemolisina que produce zonas claras en agar sangre. La que produce *L. seeligeri* es más débil, mientras que *L. ivanovii* produce zonas bien definidas.

El género *Listeria* crece bien en caldo con infusión de cerebro – corazón, en caldo con soya - tripticasa y en caldo triptosa. Todas las especies hidrolizan esculina, y crecen en presencia del 10% a 40% de bilis, en medios con 0.025% de acetato de talio y 0.04% de telurito de potasio, pero no crecen en presencia de un 0.02% de azida sódica. También son capaces de crecer en concentraciones del 10% de cloruro de sodio y pueden sobrevivir por largos períodos de sequía o congelamiento con una subsecuente reactivación. En medios de cultivo sólidos como el agar nutritivo forma colonias de 0.5 a 1.5 mm, circulares, translúcidas, con apariencia de gotas de rocío, convexas. Si el medio contiene carbohidratos fermentables, las colonias pueden alcanzar hasta 3 mm de diámetro (Lovett, 1988; Jones, 1990; Farber y Peterkin, 1991; Jay, 1994).

Perfil serológico

Las especies de *Listeria* se caracterizan por poseer antígenos que dan origen a 17 serovariedades. Los antígenos somáticos O (1 - 4) originan 15 serovariedades y los antígenos flagelares o antígenos H (a - e) a 5. Los determinantes antigénicos de los antígenos O son el ácido teicoico dividido en dos tipos. En el primer caso, los residuos de ribitol están unidos covalentemente por enlace fosfodiéster entre el C1 y C5 y algunas veces se encuentra sustituido con N acetilglucosamina en el C2; este tipo se encuentra asociado con los serotipos 1/2a, b y c, 3a, b y c y 7. En el segundo caso la N acetilglucosamina está integrada en la cadena; este tipo está asociado con los serotipos 4a, b y d. Los ácidos lipoteicoicos, que mediante un enlace covalente tienen unido un glicolípido al fosfomonoéster terminal del ácido teicoico, forman parte de la envoltura celular (Farber y Peterkin, 1991; Jay, 1994).

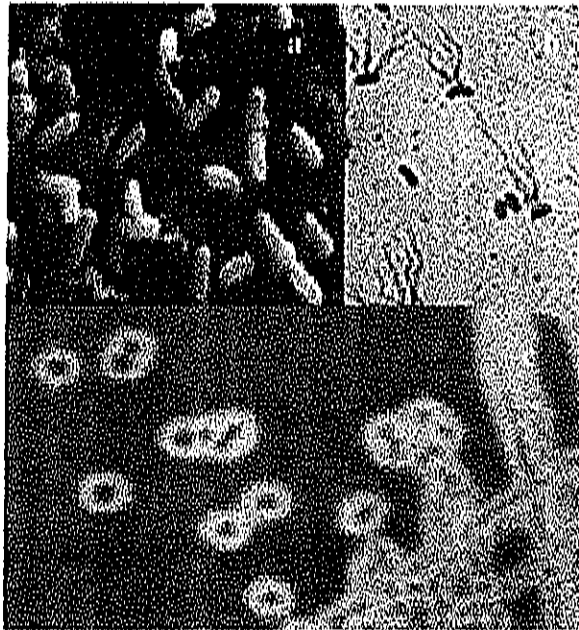


Figura 1. Características celulares y fenotípicas de *L. monocytogenes*

- a) Bacilo corto, gram positivo
- b) Desarrollo de flagelos a 25° C
- c) Hemólisis en agar sangre.

Cuadro I. Diferenciación bioquímica de las especies de *Listeria*

	β - hemólisis	Reducción de Nitratos	D	M	E	Ma	R	X	CAMP/S.a	CAMP/R.e
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	+	+	+	-	bV	-	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-	+	+	+	-	bV	+	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-	+	+	+	-	-	+	+	-
<i>L. grayi</i>	-	bV	+	+	+	+	bV	-	-	+

bV Variable
D Dextrosa
M Maltosa
E Esculina
Ma Manitol
R Ramnosa
X Xilosa

I Puede haber reacciones débilmente positivas, particularmente a las 48 h de incubación
Fuente: NOM-143-SSA1-1995

Listeria monocytogenes es considerada la principal especie patógena y está representada por 13 serovariedades, algunas de las cuales son compartidas por *L. innocua* y por *L. seeligeri*. Si bien *L. innocua* está representada sólo por tres serovariedades, a veces es considerada como una variante no patógena de *L. monocytogenes*. La mayor heterogeneidad antigénica de esta última especie puede estar relacionada con el gran número de hospedadores animales en lo que es capaz de multiplicarse. Diversos estudios demuestran que sólo se han relacionado con brotes de listeriosis y casos esporádicos 3 de las 13 serovariedades de *L. monocytogenes*: 4b, 1/2a y 1/2b, a nivel mundial han estado involucradas en el 90% de las afecciones. En Estados Unidos y Canadá la serovariedad 4b ha producido del 65 al 80% de los brotes de listeriosis. Al parecer se adapta con mayor facilidad a las células hospederas que los serogrupos 1/2. El grupo que se registra con mayor frecuencia en Europa Oriental, África Occidental, Alemania Central, Finlandia y Suecia es el 1/2a, mientras que los 1/2b y 4b se encuentran frecuentemente en Francia y Holanda con proporciones iguales (Jay, 1994; Raybourne, 2002).

La serovariedad 4b de *L. monocytogenes* se caracteriza por ser más virulenta, que los serotipos 1/2a y 1/2b, también patógenos. Sin embargo algunos estudios realizados en ratones por Vázquez y col. (2001) y Rodas y col. (2001) en México, demostraron que las cepas aisladas de leche cruda del serotipo 1 fueron patógenas, mientras que las del serotipo 4 (hemolíticas y no hemolíticas) fueron menos virulentas o no fueron capaces de causar enfermedad ni muerte en los animales. En otras investigaciones tampoco se ha logrado encontrar una relación entre estas tres serovariedades y la letalidad en ratones. La dosis letal₅₀ (DL₅₀) que se encontró al inocular estos animales vía intraperitoneal y vía intragástrica fue prácticamente la misma (4×10^6 UFC/mL). Sin embargo, con la segunda ruta se obtuvo una mortalidad más rápida (Raybourne, 2002).

Reservorios y Rutas de Transmisión

Humanos, animales y medio ambiente son reservorios de *Listeria monocytogenes*. El germen se ha aislado de 42 especies de mamíferos silvestres y

domésticos, 22 especies de aves de las cuales las domésticas, las canoras y las de rapiña pueden ser los vectores responsables de inocular *L. monocytogenes* en el alimento del ganado (ensilado). Esas aves contribuyen de manera indirecta a la listeriosis de animales de granja y humana. No está confirmado que otros animales contribuyan a la enfermedad, pero existe la posibilidad (Brackett, 1988). La bacteria casi siempre se asocia con el tracto gastrointestinal o con infecciones latentes en animales domésticos y humanos. Los animales de granja son mayormente identificados como reservorios de esta bacteria. Del 1 al 5% del ganado vacuno y caprino son portadores sanos o asintomáticos (Figura 2). Sin embargo, otros animales como los roedores, anfibios, pescados e insectos pueden ser portadores pero su papel en los casos de listeriosis humana no está bien definido (Jay, 1994). Así mismo, el germen parece ser un residente normal del tracto gastrointestinal de humanos. Esto puede explicar la presencia común de anticuerpos contra *Listeria* sp. en los individuos sanos. El número de portadores se ha estimado mediante el examen de la materia fecal. Los resultados expresan tasas desde 0.5% (9 de 1732) hasta 91.7% (11 de 12). Alrededor del 5 al 10% de la población en general pueden ser portadores del microorganismo (Gellin y col., 1989).

También se han encontrado niveles de *Listeria* comparables con los de *Salmonella* en aguas residuales tratadas y no tratadas, así como efluentes de rastros, plantas empacadoras de pollos y mercados de ganado. En aguas superficiales se han detectado concentraciones elevadas, por lo que el uso de este tipo de agua para riego y fertilización es de alto riesgo. Así mismo, ciertas prácticas de acuacultura pueden conducir a la contaminación de peces y mariscos destinados para el consumo de humanos y animales por la utilización de estiércol o agua de desecho como fertilizante. Además de las rutas directas de contaminación, las condiciones no sanitarias en las plantas de procesamiento pueden contaminar los alimentos. *Listeria monocytogenes* puede encontrarse en los suministros de agua no clorada, áreas de enfriamiento húmedas, patas del equipo, marcos oxidados, resumideros, unidades de refrigeración, sistemas de aire, bandas transportadoras y superficies de acero inoxidable grabadas.

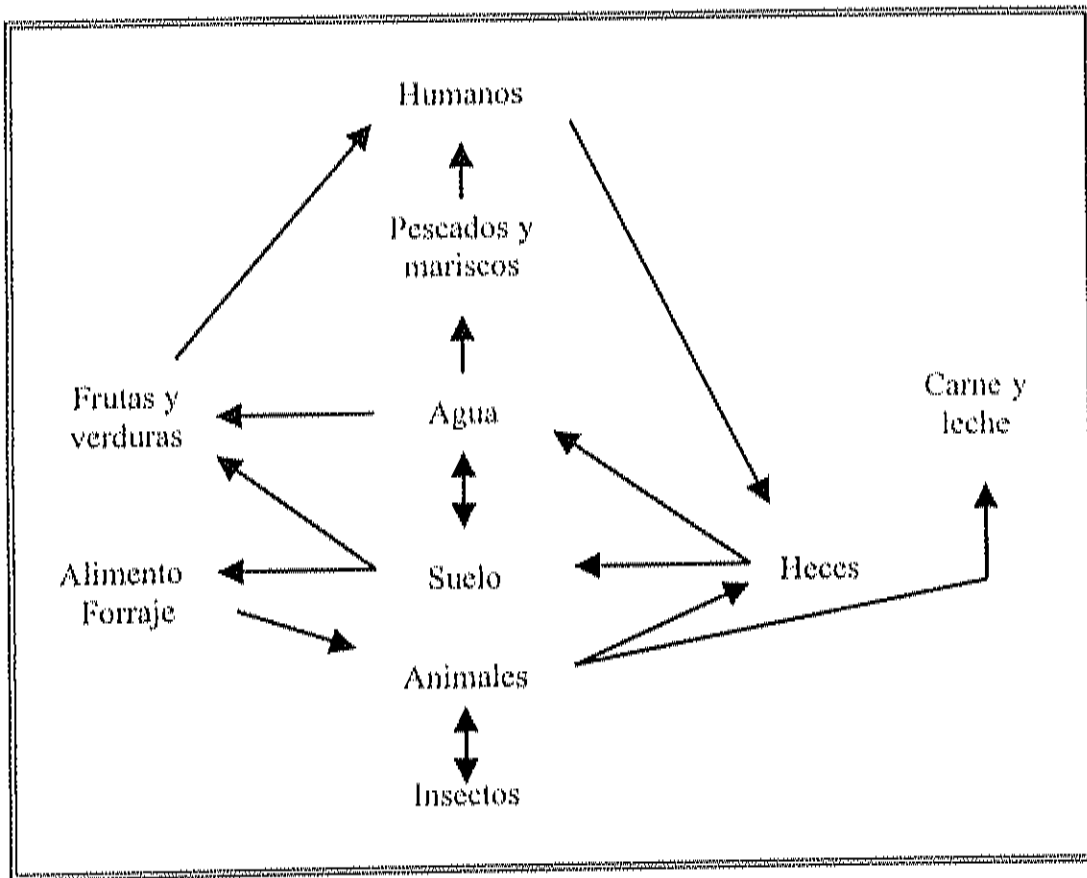


Figura 2. Posibles rutas de transmisión de *L. monocytogenes*.
Fuente: Brackett, 1988

La capacidad de *L. monocytogenes* para adherirse a las superficies representa una fuente de contaminación potencial para una amplia variedad de material que llega a estar en contacto con superficies sólidas. El patógeno puede adherirse al acero inoxidable y producir fibras de flagelina. También se adhiere a vidrio y plástico produciendo una biopelícula resistente a los desinfectantes, que se desarrolla cuando los microorganismos colonizan la superficie y forman una monocapa o multicapa de células (Mafu y col., 1991).

Patogénesis

Para entender un brote de listeriosis, uno de los principales problemas, desde el punto de vista científico y perspectivas regulatorias, es el papel que juegan los factores de virulencia de *L. monocytogenes* y su interacción con un hospedero susceptible. Cuando es adquirida vía oral, se cree que coloniza el tracto intestinal iniciando el curso clínico de la infección usualmente 20 horas después de la ingestión de un alimento fuertemente contaminado, en casos de gastroenteritis. El período de incubación para una enfermedad invasiva es más largo, de 20 a 30 días (Vázquez-Boland y col., 2001).

L. monocytogenes es un microorganismo que invade los tejidos, incluida la placenta de las mujeres gestantes y pasa a la corriente sanguínea desde donde alcanza otras células sensibles del organismo. Como patógeno intracelular primero debe penetrar las células y después ser capaz de replicarse en el interior de las mismas. En el caso de los fagocitos, la penetración tiene lugar en dos fases: directamente a los fagosomas y de los fagosomas al citoplasma de los fagocitos. Las cepas que producen listeriolisina O (LLO) proliferan dentro de la célula invadida. LLO no interviene en la penetración de los microorganismos en los fagocitos. La invasión a nivel intracelular es favorecida por una proteína extracelular distinta, denominada p60, que también se expresa en cepas no virulentas. Sin embargo este tipo de cepas no son capaces de proliferar a nivel intracelular.

Una vez que una célula de *L. monocytogenes* ha sido englobada por un macrófago, LLO permite a la bacteria romper el fagosoma en el citosol y ya liberada, en

pocas horas es rodeada por una cubierta de filamentos de actina que facilita su desplazamiento en el interior del macrófago y posterior diseminación a macrófagos contiguos. El hecho de que esta hemolisina sea activa a un pH de 5.5, indica que puede ser activa en el interior de los fagosomas. LLO como citolisina que produce poros activada por grupos SH, se fija a las membranas que contienen colesterol y de este modo provoca la salida de las moléculas del citoplasma que acaba con la muerte de la célula.

Por otro lado en *L. monocytogenes* existe una fracción que suscita la producción de anticuerpos de inmunoglobulina M (IgM). Representa aproximadamente el 6% del peso seco de las células y está unida a la membrana plasmática. Tiene un peso molecular de aproximadamente 1 kDa, no contiene aminoácidos ni carbohidratos y solamente estimula las células mononucleares, posee escasa toxicidad tisular y es inactiva desde el punto de vista serológico. Parece contradictorio que un patógeno intracelular suscite la producción de células mononucleares (de ahí el nombre específico de *monocytogenes*) que finalmente lo destruirán, pero la actividad productora de monocitosis (MPA) destruye los macrófagos *in vitro*, es posible que *in vivo* tenga la misma función (Schlech, 1988; Gellin y col., 1989; Farber y Peterkin, 1991; Jay, 1994).

En un estudio realizado por Erdenlig y col. (2000) las cepas patógenas de *L. monocytogenes* expresaron factores de virulencia como fosfatidilcolina–fosfolipasa C (PC-PLC) y fosfatidilinositol–fosfolipasa C (PI-PLC) que están implicados en el escape de la bacteria del fagosoma. Sin embargo, una cepa clasificada como avirulenta expresó altos niveles de estos factores mientras que una hemolítica no fue patógena. Estos resultados sustentan que la patogenicidad de *L. monocytogenes* es un proceso complejo y requiere que múltiples factores de virulencia sean expresados en los diferentes estadios de la infección.

Los bajos niveles de LLO y lecitinasas producidos *in vitro* no se relacionan con la patogenicidad de *L. monocytogenes* en estudios con ratones. Los factores principales que afectan la expresión de los genes de virulencia son la disponibilidad de hierro, estrés nutricional y la temperatura. En condiciones mínimas de hierro la producción de hemolisina se ve aumentada, mientras que disminuye en un medio rico en este mineral

(Rípio y col., 1996). En general, estudios *in vitro* e *in vivo* no muestran un patrón constante de factores de virulencia que marque una diferencia clara entre cepas aisladas de casos clínicos, cepas aisladas de alimentos involucrados con casos de listeriosis y las aisladas de alimentos no relacionados con la enfermedad (Raybourne, 2002).

Listeriosis y Poblaciones Susceptibles

Sólo las especies hemolíticas de *Listeria* están asociadas con patogenicidad y *L. monocytogenes* la única especie considerada como patógeno transmitido por alimentos. *L. ivanovii* raramente ha sido involucrada en patologías humanas y *L. seeligeri* fue reportada sólo una vez como causante de meningitis en un adulto sano, pero en general es considerada no virulenta.

Listeria monocytogenes produce una toxina citolítica y hemolítica llamada listeriolisina O, que actúa como un importante factor de virulencia, la cual es una de las características más definidas de este microorganismo. Es causante de una enfermedad conocida como listeriosis. Se presenta con una variedad de síntomas como meningitis, septicemia, infecciones materno – fetales y diarrea poco severa. Se considera la cuarta causa más común de infección meníngea en adultos, después de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* y *Streptococcus* del grupo B. Existen formas atípicas de la enfermedad (5 a 10% de los casos) como endocarditis (la tercer forma más frecuente), miocarditis, arteritis, neumonía, abscesos localizados, entre otras y en vacas es causa de mastitis (Vázquez-Boland y col., 2001). Se sabe que es una bacteria oportunista, por lo que existen condiciones que predisponen a la población como la edad y la inmunosupresión. Los datos epidemiológicos indican que en la mayoría de los casos la exposición al patógeno procede de los alimentos.

En Estados Unidos *L. monocytogenes* causa en promedio 2500 infecciones de 76'000,000 estimadas por el consumo de diversos alimentos contaminados. Sin embargo, es responsable de la muerte de una cuarta parte de los individuos infectados. Cerca del 90% de los casos que se reportan requieren hospitalización (Norton, 2002;

Wesley, 2002). A pesar de que la listeriosis no aparece de manera frecuente (dos a siete por millón de habitantes), entre el 20 y 30% de los casos, tanto epidémicos como esporádicos son mortales. La tasa de letalidad es mayor (hasta 45%) en personas vulnerables (inmunosuprimidas), entre las que se incluyen mujeres embarazadas, recién nacidos, individuos inmunodeficientes y ancianos, mientras que es menor en personas sin factores de predisposición. La proporción de casos fatales es más alto que la asociada con otros patógenos transmitidos por alimentos (Raybourne, 2002).

La incidencia más alta de listeriosis se da entre población expuesta al mayor riesgo por alteraciones o deficiencias de la respuesta inmunológica como resultado de medicamentos inmunosupresores, cáncer, SIDA, etc. Los datos recogidos en Francia indicaron que pacientes expuestos al mayor riesgo fueron los receptores de transplantes de órganos (200 casos/100 000 receptores), los pacientes que sufren de cáncer (13/100 000 pacientes) y las personas con más de 65 años de edad, sin enfermedades latentes conocidas (14/100 000 individuos). Los datos de Estados Unidos indicaron una incidencia de listeriosis entre pacientes infectados por el VIH de 52/100 000 pacientes y entre enfermos de SIDA de 115 casos por cada 100 000 pacientes (Codex Alimentarius, 2001). También los abortos, partos anticipados y nacimientos de fetos muertos, son a menudo secuelas de esta enfermedad. Un recién nacido puede ser infectado en el momento del parto iniciándose los síntomas (meningitis) entre la primera y cuarta semana después del nacimiento. El periodo de incubación habitual puede ser desde un día hasta varias semanas. Las mujeres enfermas que no están embarazadas son muy resistentes a la infección.

La dosis mínima requerida para causar enfermedad en los humanos no está determinada, pero la gran cantidad de bacterias detectadas en alimentos responsables de casos epidémicos y esporádicos (generalmente 10^6 UFC/g) sugiere que es alta, sin embargo, esos datos deben tener una cuidadosa interpretación. Debido al largo periodo de incubación en listeriosis invasiva y al tiempo transcurrido entre el diagnóstico y el análisis del alimento ingerido, la bacteria pudo haberse multiplicado. Por lo anterior no se debe descartar que concentraciones bajas pueden ser causa de infección, por lo menos

en individuos inmunosuprimidos, embarazadas y/o ancianos. El estado inmunológico del hospedero determina la virulencia de *L. monocytogenes*, ya que una cepa en particular puede ser poco o no virulenta en la mayoría de los individuos, pero mostrarse patógena en personas con predisposición (Vázquez-Boland y col., 2001).

Brotos de Listeriosis

El primer brote de listeriosis registrado ocurrió en Europa después de la segunda guerra mundial, cuando se racionó la leche y fue vendida en el mercado negro. Desde entonces, se ha comprobado que la enfermedad se presenta esporádicamente en todo el mundo. La listeriosis transmitida por alimentos se puede presentar de tres formas: una se trata de casos aislados, en los que casi no se tiene información sobre el alimento que los ha provocado debido al largo periodo de incubación (de días a semanas). Otra forma se presenta como un brote que afecta a un único lote de alimentos contaminados. Estos casos, por lo general, se deben a errores en la manipulación de los alimentos que dan oportunidad a que la bacteria se multiplique antes de que sea consumido. Una vez que se elimina la cantidad de alimento afectado, no se vuelven a producir más casos. La última forma consiste en brotes de unos pocos a varios cientos de casos, diseminados en el tiempo y con localizaciones variadas. Generalmente se deben a una cepa excepcionalmente virulenta que se ha establecido en el ambiente y contamina lotes múltiples de alimentos a lo largo de días o meses de producción (Codex Alimentarius, 2001).

A *Listeria monocytogenes* se le ha relacionado con epidemias y casos esporádicos de listeriosis asociados con la ingestión de leche y derivados lácteos. Ejemplo de ellos son los ocurridos en Massachusetts en 1983 por el consumo de leche pasteurizada contaminada. De 49 casos confirmados, 14 murieron (Fleming, 1985). En California y Texas en 1985 por consumo de queso fresco estilo mexicano, donde 142 personas resultaron infectadas y 52 fallecieron (Altekruse y col., 1998). Desde 1985, *L. monocytogenes* se ha encontrado en diversos productos lácteos en Texas, leche con

chocolate en Massachusetts, helados en Iowa y Wisconsin, mezcla de leche helada y caseína en California, queso blando estilo mexicano en Arizona y en productos lácteos similares de otras localidades.

En julio de 1994 en el estado de Illinois se presentó un brote de gastroenteritis donde 52 de 64 adultos sanos se vieron afectados. La causa fue leche con chocolate fuertemente contaminada. En Francia en 1995 se presentó un brote por consumo de queso brie elaborado con leche cruda. Cuatro personas fallecieron y veinte más resultaron infectadas, entre ellas mujeres embarazadas que abortaron. En el periodo de 1992 a 1997 fue causa de 10 epidemias y cuatro casos esporádicos por el consumo de leche y derivados lácteos (IFST, 1998; Buyser y col., 2001). En el año 2001 en el estado de Carolina del Norte se vieron afectadas 12 mujeres inmigrantes mexicanas embarazadas, por consumir queso fresco elaborado con leche sin pasteurizar (Boggs y col., 2001).

Reportes recientes indican una forma no invasiva de listeriosis que causa gastroenteritis con fiebre. Los factores que la influyen no se encuentran totalmente esclarecidos puesto que cabe la posibilidad de que cada variante patógena interactue de manera diferente con el hospedero. Esta faceta de la enfermedad puede afectar a personas que no tienen predisposición, por lo que el significado de *L. monocytogenes* con respecto a la salud pública aumenta. Sin embargo, la incidencia de la infección en su forma no invasiva puede estar subestimada dado que a esta bacteria no se le busca comúnmente como una causa de enfermedad gastrointestinal (Dalton y col., 1997; Aureli y col., 2000; Franciosa y col., 2001).

Aunque en varios países de América Latina se han presentado casos esporádicos de listeriosis, en México los reportes son muy escasos. En 1981 sólo se conocían 16 casos de este padecimiento, 12 con meningoencefalitis y 4 con septicemia, hasta 1987 se habían reportado 36 casos. Cabe destacar que la listeriosis en nuestro país es poco notificada y esto hace pensar en una subevaluación del padecimiento, por lo que en la actualidad la verdadera incidencia se desconoce. En las áreas rurales es común el consumo de productos lácteos elaborados con leche cruda y no hay un registro de las

enfermedades que se han suscitado por el consumo de estos alimentos (Alaniz de la O y col., 1998; Rufz y col., 1998; Vázquez y col., 2001). Para la obtención de datos fidedignos sobre la incidencia de listeriosis, se deben notificar a nivel nacional todos los casos en los que la bacteria haya sido aislada de la sangre o el líquido cefalorraquídeo de cualquier paciente (Codex Alimentarius, 2001).

En Sonora un primer estudio realizado en 1996 en la ciudad de Hermosillo muestra la ausencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos (Díaz y col., 1998b). Sin embargo, en 1998 se identificó la presencia del patógeno en 4 de 100 muestras de queso fresco, obtenidas a nivel estatal. El análisis se realizó siguiendo la técnica oficial NOM-143-SSA1-1995. Este porcentaje de incidencia se puede considerar como un riesgo para la salud de los consumidores tomando en cuenta que los casos de listeriosis humana ocurren principalmente en forma esporádica (García y col., 2000).

Alimentos Implicados

L. monocytogenes es una bacteria que se encuentra distribuida de manera generalizada en plantas, suelo, aguas superficiales y alimento para ganado. Se puede encontrar en la leche de vacas sanas y mastíticas (pudiendo llegar a desechar 5×10^6 UFC/mL). También se ha encontrado en heces humanas y animales (Gellin y Broome, 1989; Farber y Peterkin, 1991; Jay, 1994). Los datos puestos a disposición de los evaluadores de riesgos de la FAO/OMS demostraron que la bacteria se encuentra en alimentos, tanto crudos como procesados, tiene la capacidad de sobrevivir y crecer durante el almacenamiento de éstos, ya sea a temperatura ambiente o de refrigeración.

Los alimentos con alto contenido de proteína como el pescado, carne, aves y productos elaborados con leche cruda son los más involucrados en las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos (ETA). En general, *Listeria monocytogenes* se ha aislado de diferentes derivados lácteos, carne fresca y congelada, embutidos, alimentos listos para consumo, aves de corral, productos marinos, frutas y verduras. Debido a que los brotes de listeriosis más importantes están asociados con leche y sus

derivados, éstos reciben un mayor énfasis en los programas de vigilancia industrial y regulatorio (Mantynen, 1999).

La incidencia de *L. monocytogenes* en leche cruda y derivados lácteos varía entre países, en Alemania es del 0.32%, en Francia del 2 a 4%, en Holanda del 4% y en Massachusetts, E.U. del 7% (Vázquez y col., 2001). En países de América Latina como Brasil se encontraron incidencias del 41.17% en queso fresco elaborado artesanalmente, 3.03% en queso fresco y ricotta elaborado industrialmente y del 5.67% en quesos madurados como brie, roquefort y gorgonzola. (Delgado da Silva y col., 1998). En Venezuela se encontró una incidencia del 2% en queso blanco duro, tipo llanero (Citti y col., 1999). En Santiago de Chile la incidencia fue del 0.8% en quesos blandos (Cordano y Rocourt, 2001). En México se han realizado algunos estudios en estados como Jalisco donde se muestran incidencias del 12 al 27% en diferentes tipos de quesos (Luis Juan, 1994), en Sonora es del 4 % en queso fresco (García y col., 2000) y del 13 % para leche cruda en el Distrito Federal (Vázquez y col., 2001).

El queso ha sido objeto de estudio extensivo porque de él se han aislado niveles de 10^7 UFC de *Listeria monocytogenes*/g. Este microorganismo aumenta su concentración durante el proceso de madurado en diferentes tipos de quesos. Parece ser más resistente al tratamiento térmico que los coliformes y en ocasiones puede soportar el proceso de pasteurización. Así, un producto lácteo libre de coliformes, indicador de mala calidad sanitaria, no necesariamente lo está de *Listeria monocytogenes*.

La presencia del patógeno en las carnes de puerco, pollo y res es frecuente, pero su consumo por lo general está acompañado de procesos térmicos. Sin embargo el mal manejo del producto crudo en la cocina o plantas procesadoras constituye un riesgo de contaminación cruzada hacia productos terminados. En los vegetales, el microorganismo casi siempre se encuentra en concentraciones bajas. Esto no implica que su consumo deje de ser potencialmente peligroso para la salud (Fleming, 1985; Farber y Peterkin, 1991).

Unos alimentos parecen ser de mayor riesgo que otros. Los primeros son los que permiten el crecimiento de *L. monocytogenes*, se almacenan a temperaturas de

refrigeración por periodos prolongados y son listos para consumo. Éstos incluyen a los quesos blandos de baja acidez (camembert, y queso fresco estilo mexicano). En contraste los alimentos listos para consumo que no sostienen el crecimiento del germen durante su vida útil, se consideran de bajo riesgo (Meng y Doyle, 1997). Existen pocas pruebas de que el consumo de niveles bajos (<100 UFC/g) del germen en los alimentos, origine listeriosis. Sin embargo, niveles de 10^2 UFC/g se han asociado con la infección (Farber y Peterkin, 1991; Vázquez y col., 2001). Los productos que pueden favorecer la proliferación por encima de este nivel pueden plantear determinados riesgos cuando hay crecimiento por encima de un nivel de al menos 1000 UFC/g (Codex Alimentarius, 2001).

Algunos países como Estados Unidos e Italia, tienen cero tolerancia con respecto a la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos (ausencia en 25 g de muestra), mientras que Alemania, Holanda y Francia tienen una tolerancia por debajo de 100 UFC/g en el producto terminado. Finalmente, otros países como Canadá y Dinamarca tienen tolerancia por debajo de 100 UFC/g para unos alimentos y cero tolerancia para otros, como los quesos, que permiten el crecimiento del microorganismo (Norrung, 2000).

Métodos de Detección en Alimentos

En los países subdesarrollados, más del 30% de los alimentos que se producen no son sometidos a ningún tipo de acción contra microorganismos. El número de casos de gastroenteritis se estima en 300 por 1000 personas al año y sólo se reporta el 5% de las enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos (Mantynen, 1999). En México, entre 1992 y 1996 el sistema de vigilancia epidemiológica nacional notificó 244 brotes de enfermedades transmitidas por el consumo de alimentos, con un total de 12,596 casos y 98 muertos. En 99 brotes (40.6%) se identificó la causa, se encontró que el 75.7% fueron provocados por agentes bacterianos, el 8.1% por toxinas, el 4.1% por virus y químicos y el 4% por parásitos. En el 59.4% restante no se logró identificar al agente causal (OPS, 1998). Estas estadísticas demuestran la importancia de contar con técnicas

de detección rápidas y precisas que permitan actuar de inmediato en el momento que se presentan brotes toxi-infecciosos o bien para prevenirlos.

En la microbiología de alimentos, la presencia de un solo microorganismo patógeno se considera como significativo para afectar la salud de quien lo consume. Algunos son difíciles de cultivar en medios sintéticos, por lo que su desarrollo es lento. Cuando se analizan productos perecederos (leche, quesos, carnes, etc.) antes de su venta al público, el tiempo que transcurre para obtener el resultado es el principal factor en contra. La primer técnica para detectar *L. monocytogenes* en productos alimenticios fue diseñada en 1948. Consiste en preenriquecer las muestras en frío, aprovechando la característica de la bacteria para desarrollarse a 4° C o menos, lo que inhibe la mayor parte de la flora competitiva. Sin embargo, la proliferación del patógeno a esa temperatura es lenta y puede llevar varias semanas identificarlo (Gellin y col., 1989; Wolcott, 1991). Este procedimiento se sigue utilizando en trabajos con fines de investigación, pero ya no está considerado dentro de las técnicas oficiales empleadas en diferentes países (Soo Ha y col., 2002).

Con excepciones, la concentración de *L. monocytogenes* en alimentos es baja, probablemente menos de 10^3 UFC/g. Se requiere preenriquecer las muestras por lo que con frecuencia no se señala el número de bacterias/g o mL. Cuando es necesario realizar un análisis cuantitativo, se utiliza la técnica estadística del Número Más Probable (NMP). El aislamiento a partir de cultivos mezclados, como en el queso, se complica por factores como composición compleja de la muestra y presencia de flora competitiva. Contiene infinidad de ingredientes como proteínas, grasas, químicos y otros compuestos que pueden tener un efecto adverso en la viabilidad de la bacteria y por lo tanto interferir con su detección. Además, algunos tratamientos como calentamiento, congelado, secado, aditivos químicos y conservadores pueden dañar subletalmente a las células bacterianas. Esas células dañadas o estresadas son extremadamente sensibles a los suplementos utilizados en los medios microbiológicos selectivos, por lo tanto pueden pasar desapercibidas por una técnica tradicional de cultivo *in vitro* dando un resultado falso-negativo. Es necesaria la utilización de métodos que recuperen células dañadas.

enriquecimientos para aumentar la densidad celular y siembra en medios selectivos con antibióticos a fin de inhibir la flora competitiva, para obtener resultados confirmativos. Este tipo de procedimientos requieren varios días.

Por otro lado, al tratar de favorecer el crecimiento de *L. monocytogenes* también se promueve el desarrollo de otras especies de *Listeria*, que pueden estar presentes en mayor proporción que el patógeno de interés, por lo que el diseño de técnicas alternativas no se ha hecho esperar. Algunas de ellas se basan en la interacción antígeno – anticuerpo, así como en la especificidad de los anticuerpos monoclonales (ELISA, perlas inmunomagnéticas). Aún estas alternativas requieren enriquecimiento de la muestra debido a que su sensibilidad es baja ($10^5 - 10^6$ UFC/g). También el número de falsos positivos es elevado ya que existen reacciones inmunológicas cruzadas entre *Listeria*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Lactobacillus*. La técnica de ELISA no hace discriminación entre *L. innocua* y *L. monocytogenes*. En algunos casos sólo identifican al género pero no la especie, lo que conduce a realizar pruebas bioquímicas y serológicas para una caracterización completa (Farber y Peterkin, 1991; Jay, 1994; Oteo y Alós, 2000; García y col., 2000).

En la detección de *Listeria monocytogenes* las autoridades regulatorias e industrias de alimentos requieren una técnica rápida, capaz de detectar concentraciones bajas ($<10^3$ UFC/g) y que haga evidente la presencia de las células dañadas; todo esto con un amplio margen de confianza. La PCR provee una herramienta rápida, selectiva y sensible en la identificación de patógenos transmitidos por el consumo de alimentos, como *Listeria monocytogenes*. Se basa en la amplificación de un fragmento de ácido nucleico que codifique toxinas o factores de virulencia específicos para cada especie bacteriana (Harris y col., 1992; Hill, 1996). Su simple metodología es tan poderosa, que en unas horas o incluso minutos permite amplificar millones de veces una secuencia determinada de ADN. La consecuencia inmediata de la PCR es acelerar los tiempos de detección de patógenos tanto a nivel clínico como de alimentos (Caballero y col., 2000). La amplificación puede ser específica (diseñados para detectar la porción concreta del

ADN de un microorganismo particular en presencia de otros). Por el contrario, la detección puede ser de amplio rango (amplificar secuencias de varios microorganismos).

Factores de Virulencia expresados por *L. monocytogenes*.

L. monocytogenes expresa diferentes factores de virulencia dependiendo de las condiciones ambientales en las que se desarrolla. Los que más se han estudiado *in vitro* son la invasión de las células epiteliales, escape de las vacuolas fagocíticas e invasión de las células adyacentes. Los principales compuestos que se asocian con la patogenicidad de la bacteria son la presencia de hierro, enzimas catalasa y superóxido dismutasa, componentes de la superficie celular, hemolisinas, proteínas asociadas a la invasión, y fosfolipasas extracelulares. La virulencia del microorganismo se ve afectada por la temperatura de crecimiento. Cuando ésta es baja (4° C), la patogenicidad aumenta en ratones inoculados vía intravenosa. Este fenómeno puede incrementar la virulencia de los gérmenes en alimentos refrigerados (Farber y Peterkin, 1991; Jay, 1994).

Los genes que más se han utilizado como región “blanco” para ser amplificados por PCR son el *hlyA* (expresa la producción de listeriolisina O), el gen *iap* (expresa la producción de proteína p60), el gen *prfA* (controla la transcripción del gen *Hly A* y otros) y el gen *inl* (expresa la producción de internalinas) (Niederhauser, 1992; Cooray, 1994; Bansal, 1996; Vines y Swaminathan, 1998; Almeida, 2000).

El gen *hlyA* codifica la producción de listeriolisina O, una proteína asociada a la sobrevivencia del patógeno dentro de la célula huésped. Es responsable de la hemólisis- β en los eritrocitos y de la destrucción de las células fagocitarias que engloban a la bacteria. Esta hemolisina tiene un peso molecular de 58 kDa y está formada por 504 aminoácidos. El gen *iap* codifica la proteína p60. Es una hidrolasa que promueve la separación de las células bacterianas durante la división celular y favorece la penetración del germen a las células fagocíticas, mediante su propia fagocitosis. Tiene peso molecular de 60 kDa y consta de 484 aminoácidos. El gen *prfA* es un regulador de la patogénesis de *L. monocytogenes*. Codifica la producción de una proteína de 27.1 kDa que permite la transcripción de varios genes que expresan factores de virulencia, como

el *hlyA*, *actA*, *mpl*, *plcB*, *plcA* entre otros (Jay, 1994; Bansal, 1996; Bubert y col., 1999; Williams y col., 2000) y por último los genes *inlA* e *inlB* codifican la expresión de las internalinas, proteínas de 95 y 65 kDa, respectivamente, que confieren invasividad sobre células de mamíferos que no son fagocíticas como las epiteliales, endoteliales y hepatocitos (Cuadro 2). Es una región medianamente conservada del genoma de *L. monocytogenes* (Vines y Swaminathan, 1998; Klein y Juneja, 1997; Vázquez-Boland y col., 2001).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

PCR es el proceso de amplificación *in vitro* donde las cadenas individuales de ADN blanco son duplicadas por una *ADN*polimerasa en cada ciclo que integra a la reacción. Al final de cada uno, las nuevas cadenas se vuelven a duplicar por la misma enzima. Así se puede logra una producción exponencial de millones de copias del gen o segmento de ADN específico sometido al proceso. Uno de los requisitos es que pequeñas secuencias de ADN (iniciadores) se unan (hibriden) con el ADN diana, delimitando un fragmento.

Por cuestiones de simplicidad se parte de una sola molécula de ADN. Al elevar la temperatura a 92° C, se produce la separación (desnaturalización) de la cadena. Posteriormente, la temperatura se reduce y antes de que las dos cadenas del ADN diana se vuelvan a unir, se da la hibridación de los iniciadores que van a delimitar el fragmento a amplificar. En el siguiente paso se eleva la temperatura, de forma que la *ADN*polimerasa termoestable presente en la reacción pueda sintetizar las correspondientes cadenas de ADN a partir de moldes existentes. En este primer ciclo se ha pasado de una molécula de ADN bicatenario a dos moléculas. Este proceso se repite varias veces (20 a 40) generando fragmentos de ADN exponencialmente (Figura 3). El producto final se puede observar en un gel de agarosa (Gibbs y Chamberain, 1989; Rodu, 1990; Barrera y col., 1993).

Dada su naturaleza exponencial, la PCR sigue la llamada "ley del todo o nada", ya que si en los primeros ciclos no se amplifica nada, probablemente no se observe

Cuadro 2. Factores de virulencia expresados por *Listeria monocytogenes*. Fuente: Raybourne, 2002

Gene	Proteína	PM (kDa)	Función	Virulencia
<i>hlyA</i>	β -hemolisina (Listeriolisina)	58	Citolisina formadora de poros, proteína secretada	Escape de las vacuolas fagocíticas
<i>actA</i>	ActA	92	Polimerización de actina, proteína de superficie	Propagación de célula a célula
<i>plcA</i>	Fosfolipasa C (PI-PLC)	32	Fosfatidil-inositol específico, proteína secretada	Accesorio en el escape de la vacuola
<i>plcB</i>	Fosfolipasa C (PC-PLC)	34	Fosfatidil-colina específico, proteína secretada	Accesorio en el escape de la vacuola
<i>mpl</i>	Metaloпротеasa	57.4	Proteasa	Accesorio en el escape de la vacuola
<i>inlA</i>	Internalina A	95	Proteína de superficie	Accesorio para la invasión
<i>inlB</i>	Internalina B	65	Proteína de superficie	Accesorio para la invasión
<i>iap</i>	Proteína p60, asociada a la invasión	60	Proteína secretada y de superficie	Factor de invasión
<i>prfA</i>	Factor A, regulador positivo	27	Proteína citoplásmica	Regula transcripción de genes <i>plcA</i> , <i>hly</i> , <i>mpl</i> , <i>actA</i> y <i>plcB</i>

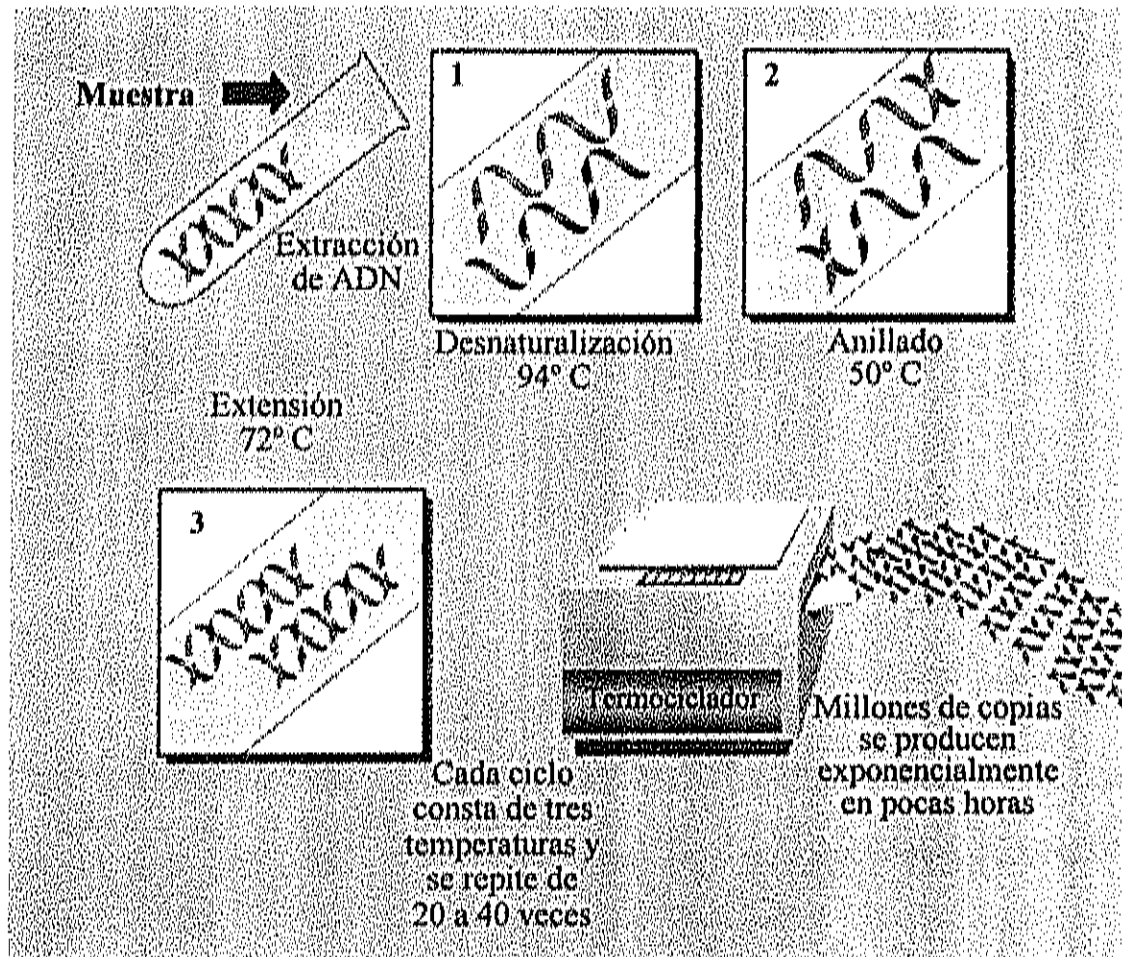


Figura 3. Amplificación *in vitro* de un fragmento de ADN (PCR)

ningún producto. Sin embargo, si en los primeros ciclos se consigue amplificar algo, se asegura que la generación del segmento correspondiente será fácilmente reamplificado en los ciclos sucesivos (Caballero y col., 2000).

Selección de los iniciadores. La secuencia de los iniciadores es responsable de la amplificación específica del fragmento deseado y para su diseño es indispensable conocer la secuencia del ADN "blanco". Dependiendo de la especificidad que se desee en la detección (género, especie, cepa), diferentes regiones del ADN pueden ser usadas como "blanco", las más comunes son las que codifican factores de virulencia. Para detectar específicamente *Listeria monocytogenes* por PCR en alimentos, los iniciadores deben amplificar una región única del genoma de la bacteria, que también esté presente en las subespecies. La longitud no debe ser mayor de 30 nucleótidos y no deben ser complementarios entre sí o consigo mismos. Se recomienda además que el contenido de G y C sea aproximadamente del 50% y que el tamaño del segmento a amplificar no exceda la capacidad de extensión de la ADNpolimerasa (idealmente ≤ 3000 pares de bases) (Barrera, 1993; Scheu, 1998).

Si las condiciones de reacción son óptimas y los iniciadores están diseñados apropiadamente, éstos se aparean a un solo sitio del ADN "blanco". Generan fragmentos amplificados de un tamaño único. En caso contrario, se obtienen fragmentos inespecíficos de diferentes dimensiones. El gen "blanco" de *Listeria monocytogenes* más utilizado para amplificar por PCR es el *hlyA*. Diversos estudios demuestran que este gen no se expresa en otras cepas hemolíticas como *L. ivanovii* y *L. seeligeri*. Es una región altamente conservada en el genoma de *L. monocytogenes*. Cuenta con 1590 pb y los iniciadores diseñados a partir de él amplifican segmentos de tamaños variables. Los más utilizados son los de 720 pb (Border y col., 1990), 606 pb (Bessesen y col., 1990), 520 pb (Golsteyn y col., 1991), y 174 pb (Denner y Boychuk, 1999). El gen *iap* es más utilizado para la detección de *Listeria* spp. ya que comparando la secuencia de ese segmento en todas las especies, se demostró que existen regiones comunes, como los extremos 5'- y -3' (Bubert y col., 1992). Sin embargo, la región media varía entre especies, pero *L. monocytogenes* y *L. innocua* tienen en común una parte considerable

de dicho gen, por lo que se complica la detección de una sola especie por PCR. Además los serotipos 4a y 4c no lo expresan por lo que no es posible la amplificación del fragmento correspondiente (Niederhauser y col., 1992; Glaser y col., 2001).

El gen *prfA* puede ser un “blanco” para detectar *L. monocytogenes* por PCR, ya que regula la transcripción de genes que expresan factores de virulencia. Los iniciadores diseñados a partir de este gen, han mostrado resultados satisfactorios, pero la listeriolisina O es indispensable para la virulencia de esta bacteria. Debido a lo anterior la mayoría de los iniciadores se derivan del gen *hlyA*. Además fue el primero en clonarse y secuenciarse en 1988 (Mengaud y col., 1988; Cossart y col., 1989; Cooray y col., 1994; Dickinson y col. 1995; Herler y col., 2001).

Ventajas y Desventajas. La PCR es una prueba selectiva y sensible. Mientras que la mayoría de los análisis bioquímicos, requieren partir de cantidades relativamente altas de material biológico, con el procedimiento molecular se requiere muy poco material de partida. Pequeñas concentraciones de ADN, que corresponden a un número bajo de células, pueden detectarse en poco tiempo. Con esta técnica se puede identificar rápidamente a *Listeria monocytogenes* en género y especie sin necesidad de aislarla. El tiempo para obtener resultados puede variar de 1 a 3 días. Este procedimiento puede automatizarse para reducir tiempo y costo (Wernars y col., 1991; Hill, 1996; Denner y Boychuk., 1999). Otra ventaja es su habilidad para detectar microorganismos que no pueden ser detectados por métodos convencionales o que no pueden ser cultivados en sustratos artificiales (Scheu y col., 1998).

Una de las desventajas de la PCR es la posibilidad de falsos-positivos a causa de la detección del ADN de células tanto vivas como muertas. En los alimentos tratados térmicamente una combinación de cultivo *in vitro* con la tecnología de la PCR aumenta la detección de células viables, aunque esto también aumenta el tiempo para la obtención de resultados (Josephson y col., 1993; Herman, 1997). Sin embargo, la presencia de algunos microorganismos (vivos o muertos) puede ser indicador de que el producto no fue elaborado con suficiente calidad sanitaria. La utilización de la técnica Transcripción

Reversa – PCR (RT-PCR) detecta únicamente células viables, utilizando el ARNm como región a amplificar. El estudio se completa en 55 horas.

La causa de las diferencias que muestran las investigaciones con respecto a la sensibilidad de la PCR, se puede relacionar con el gen de donde se diseñan los iniciadores o bien con la técnica de extracción de ADN. También, probando con diferentes variedades de quesos, se encontró que la eficiencia de amplificación de la PCR depende del tipo de queso. En cultivos puros se han detectado de hasta 1 UFC/mL mientras que en muestras de alimentos preenriquecidos las concentraciones han sido variables (Hill, 1996; So Haa y col., 2002). Tratando de aumentar la sensibilidad, posterior al aumento de densidad celular se han utilizado anticuerpos monoclonales para separar y concentrar a la bacteria (Cooray y col., 1994).

Puede ocurrir inhibición de la *ADN*polimerasa (*Taq*polimerasa) por los componentes del alimento, causada por una mala extracción del ADN (Dickinson y col., 1995). Este problema poco a poco se ha superado con el diseño de nuevas técnicas de extracción, con el mejoramiento de las que ya existen y con la búsqueda de *ADN*polimerasas que sean más resistentes a los compuestos inhibidores que se encuentran en las muestras (Rossen y col., 1992; Herman y col., 1995; Makino y col., 1995; Abu y Radstrom, 1998). Por otro lado, pequeñas concentraciones de ADN no proveniente de la muestra, puede resultar en contaminación cruzada, que se refleja en la amplificación por PCR de fragmentos no esperados. Para minimizarla se debe trabajar con guantes, en un área separada y con todo el material estéril (Harris y Griffiths, 1992).

Detección por PCR de *Listeria monocytogenes* en Quesos

A la fecha, la técnica de PCR se ha aplicado para la detección de *Listeria monocytogenes* en quesos como el camembert, brie y otros de tipo suave, pero no para queso fresco mexicano. En dichas aplicaciones, los productos se han contaminado artificialmente o la técnica se ha aplicado en muestras enriquecidas. Estas investigaciones han demostrado que es posible identificar plenamente a *Listeria monocytogenes* en género y especie (Herman y col., 1995; Starbuck y col., 1992). El

tiempo para obtener resultados puede ser de 24 horas cuando se extrae directamente de la muestra el ADN bacteriano (Herman y col., 1995; Makino y col., 1995). Los límites mínimos de detección se encuentran en un intervalo de $10^0 - 10^4$ células/g, pero eso depende del método de extracción de ADN utilizado y los resultados no son constantes (Rossen y col., 1992; Fluit y col., 1993; Gunnar y col., 1994; Scheu y col., 1998).

Algunos estudios muestran al queso como una matriz compleja que puede inhibir la PCR. En ocasiones es necesario que en la extracción de ADN se utilicen sustancias que permiten que las bacterias atrapadas en los componentes del queso estén más disponibles a la lisis (Wernars y col., 1991; Rossen y col., 1992; Powell y col., 1994). También se puede realizar un enriquecimiento de la muestra para eliminar a los componentes que interfieren. Este paso provoca un aumento de tiempo en la obtención de resultados. Por otro lado, en ocasiones la inconsistencia de resultados se debe a que el desarrollo de *L. monocytogenes* en alimentos refrigerados no es uniforme, por lo que la muestra debe seleccionarse del sitio donde se espera esté concentrada la contaminación (Fitter y col., 1992; Jay, 1994; Bansal, 1996).

En la actualidad existen ensayos comerciales de PCR para la detección rutinaria de *L. monocytogenes* tanto en alimentos como medio ambiente. Sin embargo, utilizan un sistema de preenriquecimiento de las muestras por 24 a 48 horas seguido de la amplificación por PCR utilizando diferentes iniciadores. Ejemplo de estos sistemas son Foodproof System, Probelina PCR System y BAX (Qualicon, Inc.). El tiempo que tardan en dar un resultado negativo o confirmativo es de aproximadamente 2 días. La agencia AOAC International acepta como concluyentes resultados negativos que se obtienen por este tipo de procedimientos. Los resultados positivos siempre deben ser confirmados por técnicas de cultivo *in vitro* (Norton, 2002).

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la recuperación

Descripción de la Muestra

De mayo a julio del 2001 en el laboratorio de microbiología del CIAD, A.C. se elaboraron quesos frescos a partir de leche cruda proporcionada por un productor a pequeña escala del ejido "La Victoria" en Hermosillo, Sonora. A todos los lotes recibidos se les realizó un análisis para comprobar la ausencia de *Listeria monocytogenes*.

Manejo de la leche. La leche que se utilizó era ordeñada por la mañana por lo que se recogía a temperatura ambiente para la inmediata elaboración del queso. Se emplearon 60 litros, los cuales se dividieron en cinco lotes, de 12 litros. A cada lote se le inoculó una concentración diferente de *L. monocytogenes*. De cada uno se obtuvieron 8 quesos de 200 g en promedio. Aparte, se utilizaron 2 litros para elaborar un queso control por cada porción de 12 litros.

Manejo de los cultivos. Se inocularon en Caldo Infusión Cerebro-Corazón (DIFCO, Detroit, MI) 5 cultivos de una cepa pura de *Listeria monocytogenes* (ATCC 43256). Se incubaron por 24 horas a 37° C. La densidad celular (turbidez del medio de cultivo) se ajustó al número 4 del estándar de Macfarland (12×10^8 UFC/mL). A un lote de leche cruda se le agregaron 12 mL del cultivo para una concentración final de 12×10^5 UFC/ mL de leche. Para el siguiente lote, el inóculo se diluyó un logaritmo (12×10^7 UFC/mL) y se agregaron 12 mL a la leche para una concentración final de 12×10^4 UFC/mL. En el resto de los lotes las concentraciones se fueron disminuyendo en un logaritmo sucesivamente hasta llegar a 12×10^1 UFC/mL de leche.

Elaboración del Queso. Los quesos se elaboraron siguiendo un procedimiento artesanal, semejante al utilizado en las áreas rurales. Se agregaron 3 mL de renina

(CUAMEX, Edo. Mex) por cada 12 litros de leche y se dejó reposar por 2 horas para la formación de un coágulo firme. Posteriormente la cuajada se cortó con una espátula estéril para separar el suero. Se filtró en una manta. Se molió manualmente y se le agregaron 10 g de sal. Se dividió en porciones de 200 g que se envolvieron en mantas y se prensaron en moldes. Se almacenaron a 7° C por 12 horas aproximadamente. Transcurrido ese tiempo se realizó un recuento de bacterias en placas con Agar Oxford (DIFCO, Detroit MI) siguiendo el procedimiento de diluciones propuesto por la NOM-092-SSA1-1994 para el recuento de mesófilos aerobios. En la homogenización de las muestras se utilizó agua peptonada (DIFCO, Detroit MI) al 0.1% a la que se le adicionó Tween 80 (SIGMA DE MÉXICO, Zapopan Jal.) y tripsina, (DIFCO, Detroit MI) ambos en concentración final de 0.1%. De cada lote se determinó la cantidad de *L. monocytogenes* (UFC/g) que quedó atrapada en el queso fresco.

Los controles negativos (quesos sin inocular) se elaboraron, almacenaron y procesaron igual que los quesos inoculados (Acedo, 1994). Todo el experimento completo se realizó por duplicado.

Estandarización de PCR

Amplificación del ADN de Cultivos Puros (lisis rápida)

Se utilizaron cepas puras de *L. monocytogenes* (ATCC 43256) como control positivo y de *Staphylococcus aureus* (ATCC 27933) como control negativo. Se sembraron en placas con Agar Infusión Cerebro-Corazón (DIFCO, Detroit MI) y se incubaron por 24 horas a 37° C.

De cada cultivo, con un palillo estéril, se tomaron cinco colonias que se resuspendieron en 50 µl de tris (SIGMA, St. Louis, MO) 10 mM (pH 7.5) contenidos en un microtubo (EPPENDORF, 1.5 mL).

Se agregaron 10 unidades de enzima mutanolisina (SIGMA, St. Louis MO) y los cultivos resuspendidos se incubaron (VWR Scientific Inc.) de 1 - 2 horas a 37° C.

Se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5415C) por 5 minutos a 8500 revoluciones por minuto (rpm). Se eliminó el sobrenadante y los residuos se resuspendieron en 50 µl de tris 10 mM (pH 9.0). Se centrifugaron por 5 min a 8500 rpm.

Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 50 µl de tris 10 mM (pH 9.0) más 1% de triton X-100 (EM SCIENCE, Gibbstown, New Jersey). Se calentaron en baño maría (VWR Scientific Inc., Philadelphia PA) por 10 minutos a 95° C e inmediatamente se colocaron en hielo. El ADN que se obtuvo se utilizó de inmediato para la reacción de PCR (Veyrat y col., 1999).

Se buscaron las condiciones de tiempo, temperatura y número de ciclos (estandarización), para que los iniciadores LL1 y LL2 amplificaran de manera específica y óptima el fragmento correspondiente.

Evaluación de Sensibilidad

De cada queso elaborado para el estudio de recuperación, por separado, se homogenizaron (Masticador IUL Instruments) 10 g en 90 mL de agua peptonada (DIFCO, Detroit, MI) al 0.1% que contenía Tween 80 (1 mL/L) y tripsina al 0.1%. Las muestras se incubaron a 37° C por 1 hora (Encinas, 1999). Transcurrido el tiempo, de cada una, se tomaron alícuotas de 15 mL (se cuidó no transferir residuos de queso) y se centrifugaron (Beckman GS-6R Centrifuge) a 4° C por 20 minutos a 3500 rpm. Se descartaron los sobrenadantes y los residuos se lavaron con 1 mL de tris 10 mM (pH 7.5). De aquí en adelante se siguió con el procedimiento de lisis rápida para cultivos puros propuesto por Veyrat y col. (1999).

Se determinó la concentración mínima (sensibilidad en UFC/g) de *L. monocytogenes* detectada por PCR, directamente de los quesos frescos.

Protocolo de PCR

Se utilizó el siguiente par de iniciadores diseñados a partir del gen *hlyA*:
 Iniciador derecho: LL1 5'-AACCTATCCAGGTGCTC-3'
 Iniciador izquierdo: LL2 5'-CGCCACACTTGAGATAT-3' (Golsteyn y col., 1991).

La mezcla de reacción se estandarizó para un volumen final de 50 µl con los componentes y concentraciones que enseguida se describen: 1µl de Buffer PCR 10X (PROMEGA, Madison, WI), MgCl₂ 2 mM (PROMEGA, Madison, WI), dATP, dCTP, dGTP, dTTP (PERKIN ELMER, Branchburg, Nw Jersey) cada uno en concentración de 2.5 mM, iniciador derecho (25 pM), iniciador izquierdo (25 pM) (OPERON TECHNOLOGIES, INC., Alameda CA.), 5µl de ADN, 2 unidades de *Taq*Polimerasa (PROMEGA, Madison, WI), agua bidestilada y aceite mineral (SPECTRUM, Gardena CA.).

Las muestras se colocaron en un termociclador (PERKIN ELMER, Branchburg, New Jersey) donde se programaron las condiciones de amplificación del fragmento de ADN de 520 pb (Cuadro 3). Los productos de la PCR se visualizaron realizando electroforesis (BIO-RAD Power Pac 200) horizontal (75 volts/1 hora) en geles de agarosa (SIGMA, St. Louis MO) al 0.8% (Southern, 1979). Se tiñeron con bromuro de etidio en concentración de 10 µg/mL (BIO-RAD) y se observaron en un transiluminador UV (VILBERT LOURMAT, Marne La Vallee, Francia). Los resultados se fotografiaron (FOTODYNE) para el análisis respectivo (Saiki y col., 1988; Martínez, 1998).

Prevalencia

Descripción de la Muestra

Se analizaron 101 muestras de quesos frescos proporcionados por el Laboratorio Estatal de Salud Pública (LESP) en los meses de enero a julio del 2002. Las muestras provenían de diferentes municipios del estado de Sonora: Agua Prieta, Álamos, Cananea, Cajeme, Guaymas, Hermosillo, Huatabampo, Magdalena, Navojoa, Nogales, Puerto Peñasco, Santa Ana, Sonoyta y Ures. El muestreo lo realizó Regulación Sanitaria a diferentes productores estatales.

Los quesos se analizaron por los procedimientos de la NOM – 143 - SSA1 - 1995 y por PCR. La sensibilidad de ambas técnicas se evaluó comparando el número de muestras positivas para *L. monocytogenes* por cada procedimiento.

Cuadro 3. Condiciones programadas en el termociclador para amplificar un fragmento de ADN de 520 pb del gen *hlyA*, utilizando los iniciadores LL1 y LL2.

PASOS	EVENTO	TEMPERATURA	TIEMPO
Paso 1	Desnaturalización	97°C	5 m
Paso 2	Desnaturalización	94°C	1 m
Paso 3	Alineamiento	50°C	1 m
Paso 4	Extensión	72°C	1 m
Paso 5	Repetir 36 veces	Desde paso 2	----
Paso 6	Extensión final	72°C	10 m
Paso 7	Conservación	4°C	----

Detección de *L. monocytogenes* en Alimentos por NOM-143-SSA-1995. Se tomaron 25 g de muestra, representativa del queso, tanto de la superficie como del interior. Se colocaron en una bolsa estéril que contenía 225 mL del medio de enriquecimiento Caldo de Soya y Trypticaseína con extracto de levadura (CSTEL) suplementado con tres antibióticos: cicloheximida en concentración 50 mg/L (SIGMA, St. Louis MO), ácido nalidíxico 40 mg/L (SIGMA, St. Louis MO) y acriflavina en 15 mg/L (SIGMA, St. Louis MO). Se realizó una modificación en esta etapa del procedimiento al agregar Tween 80 y tripsina, ambos en concentración final 0.1% en el mismo medio de cultivo. Las muestras se homogenizaron (Masticador IUL Instruments) y se incubaron por 48 horas a 30° C.

Después del preenriquecimiento las muestras se resembraron en los medios LPM (DIFCO, Detroit, MI) suplementado con moxalactam al 1% (SIGMA, St. Louis MO) y OXA (DIFCO, Detroit MI) con suplemento antimicrobiano para medio base de oxford (10 mL/ litro de agar) (DIFCO, Sparks MD). Las placas de agar LPM se incubaron a 30° C por 48 horas y las de medio OXA a 37° C por el mismo tiempo. Las colonias características que se desarrollaron en el agar LPM fueron pequeñas (como gotas de rocío), blancas o azul iridiscentes. En el agar OXA fueron negras, grandes y con halo negro.

De cada medio se seleccionaron cinco o más colonias típicas y se resembraron en placas de Agar de Soya y Trypticaseína con extracto de levadura (ASTEL) (DIFCO, Detroit, MI). Se incubaron por 24 horas a 37° C. Las colonias desarrolladas se utilizaron para realizar las siguientes pruebas de identificación a) Morfológicas: tinción gram y movilidad en fresco, b) bioquímicas: catalasa, movilidad en agar MIO o MTM (DIFCO, Detroit, MI), hemólisis y prueba de CAMP en agar sangre de carnero al 5% (BECTON DICKINSON de MÉXICO), reducción de nitratos (DIFCO, Detroit, MI) y la utilización de los carbohidratos dextrosa (SIGMA, St. Louis MO), maltosa (SIGMA, St. Louis MO), manitol (SIGMA, St. Louis MO), ramnosa (SPECTRUM, Gardena CA) y xilosa (SIGMA, St. Louis MO).

Detección de *L. monocytogenes* en Queso Fresco por PCR. Las muestras se analizaron siguiendo el procedimiento descrito para evaluar la sensibilidad de esta técnica molecular.

Diseño y Análisis Estadístico

Porcentaje de Recuperación

Se utilizó un diseño completo al azar, cuyo modelo es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} Variable de respuesta (Porcentaje de colonias recuperadas)

μ Efecto de la media general

τ_i Efecto del tratamiento (Cinco concentraciones iniciales en leche: 12E+05, 12E+04, 12E+03, 12E+02 y 12E+01 UFC/mL).

ϵ_{ij} Error experimental

Para el análisis estadístico se aplicó el análisis de varianza de una sola vía. Se hicieron comparaciones de medias utilizando la prueba de rango múltiple de Tukey - Kramer ($p < 0.05$).

Detección de *L. monocytogenes* (Comparación de PCR vs NOM-143-SSA1-1995)

Se utilizó una prueba de hipótesis para proporciones, mediante la prueba de chi cuadrada (χ^2) ($p < 0.05$), donde:

Variable de respuesta: Presencia o ausencia de la bacteria

Tratamiento: Fueron los dos métodos de detección.

Se utilizó el paquete JMP versión 3.1.1 para el análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Recuperación de *L. monocytogenes* en Queso Fresco

Para la elaboración del queso fresco se utilizaron 5 lotes de leche cruda de 12 litros y a cada uno se le inocularon una concentración distinta de *Listeria monocytogenes*. Se obtuvieron aproximadamente 1.7 kg de queso fresco lo que equivale a un rendimiento del 14%. Este último porcentaje está determinado por la cantidad de sólidos totales (grasa y sólidos no grasos) contenidos en la leche, ya que es la caseína el elemento principal para la formación de la cuajada. Los sólidos totales representan aproximadamente del 10.5 al 15.5 % de la composición total de la leche y las proporciones varían de acuerdo a la raza del animal, tipo y frecuencia de alimentación, época del año, entre otros factores (Badui, 1990).

Comparando los valores de sólidos totales en leche mencionados por Badui (1990) con el rendimiento obtenido de queso fresco, se puede considerar que fue alto. Lo anterior se ve reflejado en la cantidad de *Listeria monocytogenes* que se retuvo en cada uno de los quesos elaborados en el laboratorio (Figura 4). El porcentaje de recuperación resultó inversamente proporcional al inóculo y se observó una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las cinco concentraciones. De la concentración inicial mayor (12×10^5 UFC/mL) se recuperaron 13×10^4 UFC/g de queso, correspondiendo al 11 % con respecto al inóculo inicial, mientras que de la concentración menor (12×10^1 UFC/mL) se recuperaron 5×10^1 UFC/g de queso lo que equivale al 43% de la bacteria con respecto al inóculo inicial (Cuadro 4).

La capacidad de retención de la cuajada afecta al porcentaje de bacterias recuperadas, debido a que es una red proteica que forma un retículo tridimensional a partir de la caseína, previamente desnaturizada por acción de la renina. En su interior atrapa agua, sustancias de bajo peso molecular, partículas lipídicas y los

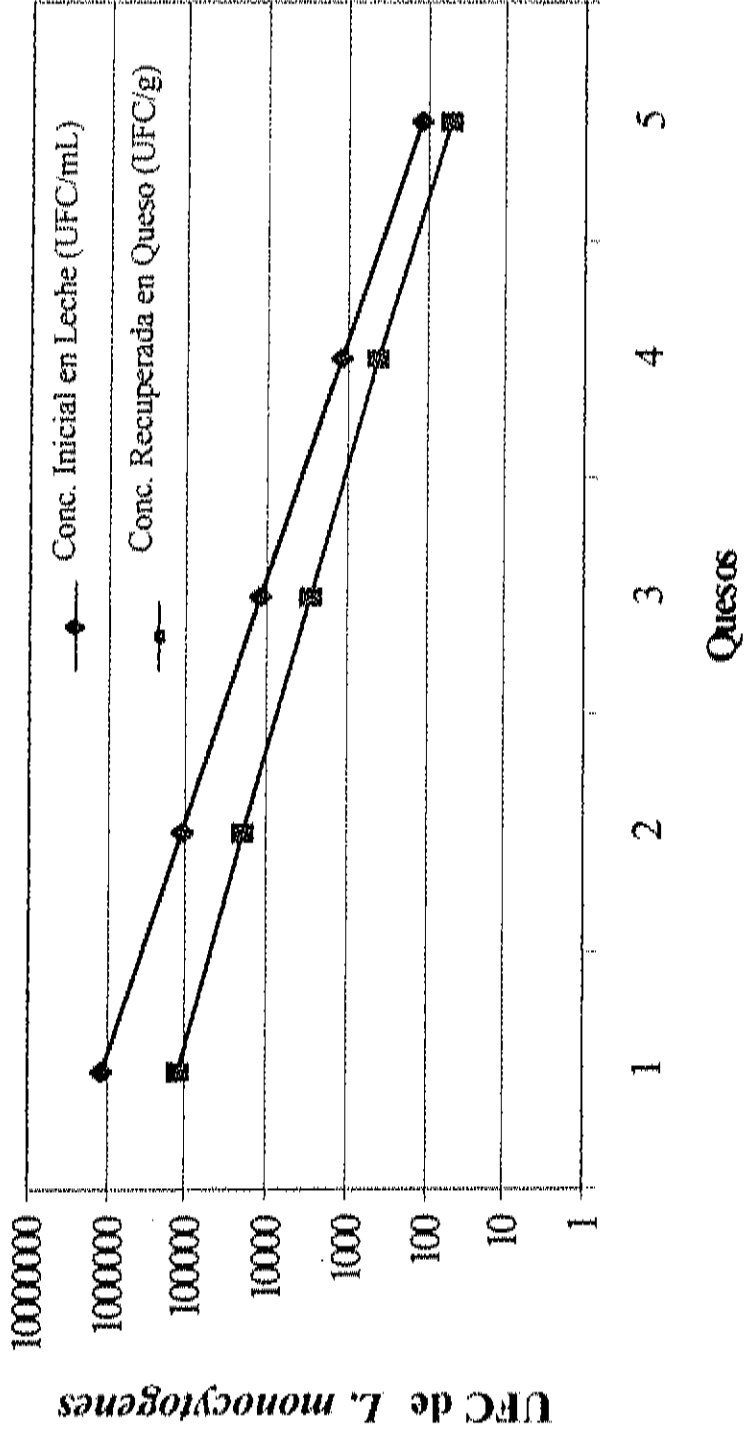


Figura 4. Recuperación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco, por el método de cuenta directa en Agar Oxford.

Cuadro 4. Promedios de recuperación de *L. monocytogenes* en queso fresco inoculando, diferentes concentraciones en leche.

Concentración inicial en leche (UFC/mL)	% Recuperación en queso fresco $\bar{x} \pm D.E.$	UFC/g recuperadas en queso fresco
12×10^5	11 ± 1^a	13×10^4
12×10^4	17 ± 1^b	2×10^4
12×10^3	24 ± 2^c	3×10^3
12×10^2	34 ± 4^d	4×10^2
12×10^1	43 ± 17^e	5×10^1

Letras distintas dentro de una misma columna indican diferencias significativas ($p < 0.05$)

D.E. Desviación Estándar

microorganismos presentes en la leche (Fox y McSweeney, 1998), sobre todo aquellos que tienden a englobarse y/o adherirse a los glóbulos de grasa como *Brucella* sp. y *Listeria monocytogenes* (Brouillaud y col., 1997). Así, mientras exista caseína disponible (en estado coloidal) para formar la cuajada, hay posibilidad de retenerlos. Cuando la proteína coagula por completo, la matriz alimenticia compleja que se forma ya no es capaz de retener una mayor cantidad del inóculo, eliminándose el excedente en el suero, junto con algunas partículas hidrosolubles (inmunoglobulinas, sales y carbohidratos). Debido a lo anterior es más factible que una concentración pequeña de bacterias quede retenida en su totalidad dentro de la cuajada, que una concentración grande (Farber y Peterkin, 1991).

En un estudio llevado a cabo en queso adobera se observó que inoculando *L. monocytogenes* en una cantidad de 2.5×10^4 UFC/mL de leche, se recuperaron 3.1×10^2 UFC/g de queso que corresponden al 12% de las bacterias con respecto a la concentración inicial (Luis Juan y col., 2001). Este dato difiere de lo obtenido en el presente trabajo con un inóculo similar de 12×10^3 UFC/mL de leche, donde se recuperaron 3×10^3 UFC/g de queso fresco, correspondiendo al 24% con relación al inóculo inicial.

El queso fresco, a diferencia del tipo adobera, se obtuvo por coagulación enzimática de la caseína, disminuyendo poco el pH cercano a la neutralidad de la leche. Lo anterior favorece una mayor recuperación de *L. monocytogenes* en el producto final, que en un queso elaborado por acidificación (Kozak y col., 1996). Se sabe que este proceso de elaboración constituye uno de los principales métodos para conservar alimentos. Los valores de pH por debajo de 5.5 son considerados como un factor de estrés para la sobrevivencia y crecimiento de la bacteria, sin llegar a inhibirla por completo. El desarrollo óptimo del patógeno se da en valores de pH entre 7 y 7.5. Los ácidos orgánicos mayormente utilizados en la elaboración de quesos, que pueden tener un efecto adverso en el microorganismo son el ácido acético > ácido láctico > ácido cítrico. La realización de recuentos de bacterias, que han estado sometidas a condiciones de estrés, utilizando medios de cultivo suplementados con antibióticos puede llevar a

una subestimación, ya que estos suplementos llegan a inhibir el crecimiento de células dañadas y/o estresadas (Jones, 1990; Farber y Peterkin, 1991).

Un factor que resultó determinante en el conteo de *Listeria monocytogenes* recuperada, fue que para la homogenización de las muestras, al agua peptonada se le agregaron reactivos como Tween 80 (0.1%) y tripsina (0.1%) para liberar a las bacterias de la matriz alimenticia quedando éstas suspendidas en el líquido. El Tween 80 es un detergente no iónico que sirve para emulsificar la grasa del queso fresco disminuyendo la tensión superficial de ésta, lo que produce su dispersión en la fase acuosa (Badui, 1990). La tripsina es una proteasa que hidroliza a la caseína rompiendo el enlace que existe del lado carboxílico de los aminoácidos lisina y arginina. En pH cercano a la neutralidad, más del 50% de esta proteína es digerida (Eskin y col., 1971). La estructura tridimensional que se formó en la cuajada se destruyó, por lo que las bacterias retenidas se liberaron y quedaron suspendidas en el líquido.

El uso de Tween 80 para evitar la interferencia de la grasa durante la recuperación de bacterias está documentada. En un estudio que se realizó con *Brucella melitensis*, la recuperación de un inóculo inicial de 3×10^9 UFC/mL en leche, osciló en 5×10^4 UFC/g de queso fresco. La cantidad recuperada se considera alta para este género bacteriano por su difícil crecimiento en medios de cultivo sintéticos (Díaz y col., 2000). En el trabajo realizado por Luis Juan y col. (2001) no se utilizó Tween 80 ni tripsina para llevar a cabo los conteos de *L. monocytogenes* y el porcentaje de recuperación fue la mitad de lo obtenido en este estudio para un inóculo similar en leche.

Finalmente, otro factor que influye en los recuentos de *Listeria monocytogenes* es el medio de cultivo en el que se realizan. Diferentes estudios han demostrado que con los que se obtiene una mayor recuperación del microorganismo son los medios de cultivo selectivos como el agar feniletanol-cloruro de litio (LPM), el agar Oxford y el agar PALCAM. En el primero las colonias crecen muy pequeñas y es necesario observarlas con la iluminación de Henry para distinguir el color azul iridiscente. Debido a ese inconveniente, se utiliza poco en estudios de recuperación.

El medio de cultivo que se utilizó para este trabajo fue el agar Oxford, ya que las colonias de *Listeria* son muy características por el desarrollo de un halo negro debido a la utilización de la esculina. Eso permitió distinguirlas fácilmente de otras colonias. En el agar PALCAM el desarrollo de las colonias de este género bacteriano también es muy característico por la aparición del halo negro. No existe diferencia entre los agares Oxford y PALCAM en cuanto a la recuperación de *Listeria monocytogenes* (Johansson y col., 2000; Lund y col., 2000). Se ha observado que otros medios de cultivo favorecen la aparición de flora competitiva que puede inhibir el crecimiento de la bacteria de interés y las colonias no presentan características diferenciales que permitan distinguirlas de otros géneros bacterianos.

Estandarización de PCR con ADN de Cultivos Puros

La utilización de PCR para detectar microorganismos patógenos en alimentos se ha incrementado en los últimos años por su rapidez, sensibilidad y especificidad. El mecanismo de amplificación de segmentos de ADN utilizando una enzima polimerasa es relativamente sencillo. Sin embargo, existen factores que afectan la eficiencia y especificidad de la técnica como la temperatura de anillado y concentración de los componentes de la mezcla de reacción: iniciadores, iones Mg^{+2} , nucleótidos, buffer y enzima *ADN*polimerasa (Hill, 1996).

Los iniciadores utilizados en este trabajo fueron diseñados a partir de la secuencia de nucleótidos del gen *hlyA* (1590 pb) y amplifican un segmento de 520 pb del mismo (Golsteyn y col., 1991). Se eligieron debido a que este gen codifica la producción de una hemolisina llamada listeriolisina O y es el principal factor de virulencia expresado por la bacteria. El gen *hlyA* no está presente en otros géneros bacterianos ni en otras especies de *Listeria*, por lo que se considera específico para la especie *Listeria monocytogenes* (Mengaud y col., 1988).

Ambos iniciadores se utilizaron en concentración 25 pM y tienen una longitud de 17 nucleótidos. El que amplifica hacia la derecha 5'-AACCTATCCAGGTGCTC-3'

(LL1) presenta una proporción de G - C del 53% y el que amplifica hacia la izquierda 5'-CGCCACACTTGAGATAT-3' (LL2) del 47% (Golsteyn, 1991). Las temperaturas de anillado fueron de 47 y 45° C respectivamente, las cuales se determinaron de acuerdo a la cantidad de triples puentes de hidrógeno que se forman durante la alineación (Dieffenbach y col., 1994). Los iones de Mg^{+2} se agregaron en forma de $MgCl_2$ en concentración 2 mM por cada reacción. El buffer está preparado comercialmente con KCl (100 mM), EDTA (0.1mM), ditiotreitól (1mM), glicerol (50%) y Tween 20 (0.5%). Cada uno de los nucleótidos se utilizaron en concentración 2.5 mM y finalmente de enzima polimerasa (*Taq*polimerasa) se agregaron 10 U por mezcla de reacción.

Con lo descrito anteriormente se establecieron la temperatura, tiempo y número de ciclos de amplificación en 94° C / 1 min para la desnaturalización, 50° C / 1 min para el anillado y 72° C / 1 min para la extensión. Todos los pasos se repitieron en 36 ciclos. Los únicos parámetros que se probaron con diferentes valores fueron la temperatura de alineación de los iniciadores en un intervalo de 50 a 55° C y la concentración de $MgCl_2$ desde 1 hasta 2.5 mM con incrementos de 0.5 mM.

Aunque la temperatura de anillado que se utilizó no es la óptima para cada iniciador por separado sí lo fue para ambos cuando se utilizaron en conjunto como se observa en la Figura 5. Este paso no debe extenderse por más de 60 segundos debido a que tiempos mayores incrementan la amplificación de segmentos inespecíficos. La enzima *Taq*polimerasa tiene actividad reducida entre los 45 y 65° C, por lo que puede incorporar nucleótidos erróneamente (Steffan y Atlas, 1991).

En la optimización de la cantidad de $MgCl_2$ se encontró que sólo con 2 mM hubo amplificación. Se sabe que la cantidad mínima necesaria de iones Mg^{+2} disminuye el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos durante la extensión. La presencia de $MgCl_2$ en la mezcla de reacción tiene efecto en el anillado de los iniciadores, en la desnaturalización del ADN y en la actividad de la *Taq*polimerasa. Altas concentraciones del mineral inhiben a la enzima y cantidades insuficientes favorecen el anillado inespecífico de los iniciadores. Algunos estudios mencionan que el intervalo óptimo de iones $MgCl_2$ varía entre 0.5 y 2.5 mM (Barrera y col., 1993, Murray y col., 1994).

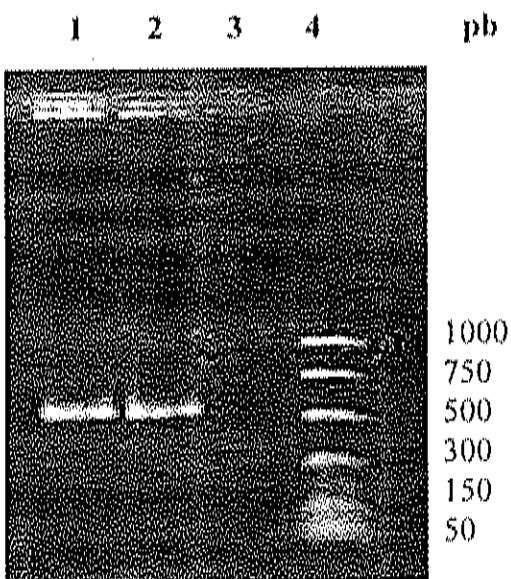


Figura 5. Amplificación por PCR de ADN de cultivos puros

CARRIL	MUESTRA
1 y 2	ADN de <i>L. monocytogenes</i> Iniciador LL1 y LL2 520 pb
3	Control (-) ADN <i>St. aureus</i>
4	Marcador de PM

En la actualidad se han encontrado diferentes polimerasas termoestables como la *Pwo*, *rTth*, *Tfl*, y *Tli* cuya acción resiste altas concentraciones de NaCl (hasta 60 mM), y de MgCl₂ (hasta 15 mM). Sin embargo, en muestras de queso (> 20 % peso/vol) la *Taq* presenta la misma inhibición que las demás enzimas (Abu y Radstrom, 1998). El resto de los componentes de la mezcla se probaron en cantidad única y no se observó ningún efecto en la amplificación.

Por último, se utilizó el ADN de *Staphylococcus aureus* como control negativo para probar la especificidad de los iniciadores, debido a que la bacteria se encuentra en concentraciones elevadas en el queso fresco regional (Díaz y col. 1998b). Se demostró que no interfiere con la detección de *Listeria monocytogenes* en este tipo de alimento. Además, el ADN de algunas bacterias productoras de hemolisinas similares a la listeriolisina O como *Bacillus cereus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus pneumoniae*, así como el de otros géneros bacterianos que incluyen a *Brucella* sp., *Escherichia coli*, *Proteus* sp, *Salmonella* sp, y las cinco especies restantes de *Listeria*: *L. ivanovii* (hemolítica), *L. seeligeri* (hemolítica), *L. grayi*, *L. innocua* y *L. welshimeri* no amplifican ningún segmento (Golsteyn, 1991). Los iniciadores solamente se alinean en un fragmento específico del ADN de *Listeria monocytogenes*, en concreto con el gen *hlyA*.

Evaluación de Sensibilidad de la PCR.

Lisis Rápida

La identificación de patógenos por PCR directamente de los alimentos requiere que el microorganismo de interés se encuentre en concentraciones elevadas (de manera natural o por preenriquecimiento), o bien, que las muestras reciban tratamientos como extracción del ADN bacteriano con fenol – cloroformo, diálisis, cromatografía de afinidad, removedores de iones (EDTA, chelex), entre otros. Todo esto se realiza con el propósito de eliminar los compuestos que interfieren con la acción de la enzima *Taq*polimerasa (Wernars y col., 1991; Bickley y col., 1996; Wesley y col., 2002). Lo

anterior alarga el tiempo de detección entre uno y tres días, pero aumenta la sensibilidad de la técnica (Starbuck y col., 1992).

En esta parte del trabajo se utilizaron los mismos quesos frescos que se elaboraron en la etapa de recuperación de *Listeria monocytogenes*. Para obtener el ADN de la bacteria inoculada en los quesos, se realizó una adaptación de la técnica de lisis rápida diseñada para colonias de lactobacilos desarrollados en medios de cultivo sólidos (Veyrat y col., 1999). Ésta consistió en homogenizar las muestras de queso fresco con agua peptonada suplementada con Tween 80 (0.1 %) y tripsina (0.1 %) para liberar a las bacterias de la matriz alimenticia. Posteriormente se tomaron alícuotas que se centrifugaron a 4° C para solidificar los lípidos presentes y eliminarlos junto con el sobrenadante. De esta manera se concentró a las bacterias, minimizando la probabilidad de inhibición de la PCR por interferencia de la grasa (Rossen y col., 1992).

Por otro lado, existe la posibilidad de que la tripsina afecte la acción de la *Taq*polimerasa hidrolizando los mismos enlaces que en la caseína (Rossen y col., 1992). Sin embargo, después de centrifugar la enzima proteolítica se eliminó en el sobrenadante y para evitar cualquier interferencia, los residuos se lavaron por segunda ocasión con buffer Tris 10 mM pH 7 eliminándose así los restos de la enzima. Después de este paso se siguió el procedimiento de lisis rápida diseñado para lactobacilos (Veyrat y col., 1999). Tomando en cuenta que *Listeria monocytogenes* es una bacteria gram positiva, cuya pared celular está compuesta por peptidoglicanos (unidades alternas de acetil glucosamina y ácido acetil murámico, que representan del 15 al 20% de la célula en peso húmedo), es más resistente a la lisis. La lisozima no es tan eficiente en la formación de los protoplastos como la mutanolisina (muramidasa) para degradar la pared celular. Actúa sobre la mureína favoreciendo la lisis celular efectuada por la acción de detergentes y calor (Murray y col., 1994).

Sensibilidad

Con la utilización de Tween 80 (0.1%), tripsina (0.1%) y mutanolisina (10 U por reacción), durante la lisis rápida de las muestras de queso fresco, se disminuyó la

interferencia causada por los componentes del alimento (grasa, proteínas, proteinasa, iones, etc.) Sin preenriquecimiento previo, se logró obtener el ADN de *Listeria monocytogenes* proveniente de quesos contaminados con diferentes concentraciones: 5×10^1 UFC/g, 4×10^2 UFC/g, 3×10^3 UFC/g, 2×10^4 UFC/g y 13×10^4 UFC/g. De todas, por PCR, se amplificó un sólo segmento de ADN de 520 pb (Figura 6) correspondiente al gen que codifica la producción de listeriolisina O, específico del patógeno inoculado. Esto es importante, puesto que en los alimentos que están contaminados naturalmente con frecuencia la concentración es de 10^3 UFC/g de muestra o menor (Bessesen y col., 1990).

Algunos estudios muestran que la PCR es capaz de detectar entre 100 fg y 1 pg de ADN, lo que equivale a 10 y 100 UFC/g de alimento, respectivamente. Sin embargo, esto sólo fue factible después de un preenriquecimiento selectivo por 24 a 48 horas (Golsteyn y col., 1991, Denner y Boychuk, 1991, Dickinson y col., 1995). Otros estudios en los que el aumento de densidad celular se utilizó con el fin de obtener una mayor cantidad del ADN de la bacteria de interés son los realizados por Bansal (1996), Manzano y col. (1998) y Soo Ha y col. (2002), sin embargo no mencionan la sensibilidad de las técnicas.

Wernars y col., (1991) realizaron la detección de *Listeria monocytogenes* directamente en queso camembert. La sensibilidad que encontraron fue muy variable. Detectaron concentraciones de 10^3 y 10^6 UFC/0.5 g de queso, amplificando un segmento de 300 pb proveniente del gen Dth 18, pero a partir de 10^8 UFC/0.5 g no fue posible la amplificación. En el presente trabajo se logró detectar de manera consistente desde 13×10^4 UFC/g hasta 52 UFC/g sin preenriquecer las muestras. No se observó inhibición de la enzima Taqpolimerasa como lo mencionan Fitter (1992), Rossen y col. (1992), Powell y col. (1994), Dickinson y col. (1995), Bickley y col. (1996) y Scheu y col. (1998).

El ADN se obtuvo directamente del alimento y después de producir la lisis se utilizó de inmediato para amplificar por PCR. No fue necesario realizar ningún paso de purificación adicional. De esta manera se evitó la pérdida de ácidos nucleicos y el

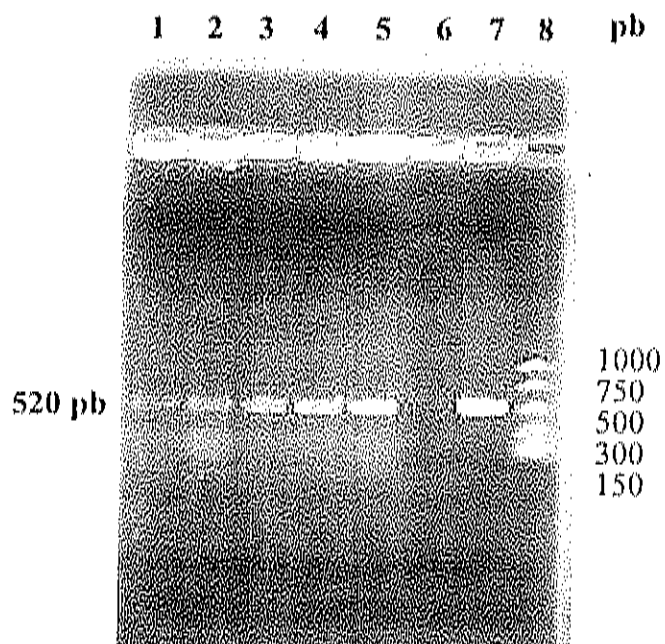


Figura 6. Detección por PCR de diferentes concentraciones de *L. monocytogenes* en queso fresco.

CARRIL	MUESTRA
1	5×10^1 UFC/g
2	4×10^2 UFC/g
3	3×10^3 UFC/g
4	2×10^4 UFC/g
5	13×10^4 UFC/g
6	Control (-)
7	Control (+)
8	Marcador de PM

ensayo se completó en menos de 24 horas. El Tween 80 y la tripsina disminuyeron la interferencia causada por el alimento, ya que las bacterias quedaron suspendidas en el líquido y al tomar la alícuota, en las que se realiza la lisis, se evitó llevar residuos de queso que pudieron causar inhibición de la *Taq*polimerasa. Además, la mayoría de los estudios se han realizado en quesos blandos y/o madurados que tienen una proporción mayor de grasa y proteína (> 20 a 40%) que el queso fresco sonorense (<20%) (Díaz y col., 1998b).

Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en el Estado de Sonora

Durante el período de enero a julio del 2002 se analizaron 101 muestras de queso fresco provenientes de varios municipios de Sonora: Agua Prieta, Álamos, Cajeme, Cananea, Guaymas, Hermosillo, Huatabampo, Magdalena, Navojoa, Nogales, Puerto Peñasco, Santa Ana, Sonoyta y Ures, distribuidas como se observa en el Cuadro 5. En 11 de los 14 municipios se encontró *L. monocytogenes*. La incidencia entre ciudades varió desde 0 hasta 50 % de quesos positivos, utilizando las técnicas de la norma oficial y PCR como procedimientos de detección (Cuadro 5). Se observó que la distribución de la bacteria fue a nivel estatal, sin encontrarse en una región en particular, contrario a lo que sucede con *Brucella* sp., cuya prevalencia es mayor en la leche cruda y quesos frescos del sur de Sonora (Díaz y col., 2000).

Del total de muestras analizadas, 10 (9.9%) dieron positivas para *Listeria monocytogenes* por la norma oficial mientras que por PCR lo fueron 23 (22.8%), existiendo diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ambos procedimientos (Cuadro 6). La prevalencia de la bacteria en los quesos frescos de Sonora, utilizando la técnica oficial, aumentó de 4% (García y col. 2000) a 9.9%. Esta cifra coincide con el 13% reportado para leche cruda en el Distrito Federal (Vázquez y col., 2001) y con el 12 a 27% de diferentes tipos de quesos frescos en el estado de Jalisco (Luis Juan, 1994). Con respecto al porcentaje de prevalencia obtenido por PCR, no existen reportes en ningún tipo de queso o leche con los cuales comparar este resultado. A pesar de ello, se demostró que el

Cuadro 5. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco por municipios

MUNICIPIO	MUESTRAS	NOM	PCR
Agua Prieta	4	2 (50%)	2 (50%)
Álamos	5	0	0
Cananea	3	1 (33.3%)	1 (33.3%)
Cajeme	12	1 (8.3%)	1 (8.3%)
Guaymas	10	0	5 (50%)
Hermosillo	20	0	4 (20%)
Huatabampo	7	2 (28.5%)	1 (14.2%)
Magdalena	7	0	0
Navojoa	6	1 (16.6%)	1 (16.6%)
Nogales	3	0	1 (33.3%)
Santa Ana	9	0	1 (11.1%)
Sonoyta	6	1 (16.6%)	3 (50%)
Puerto Peñasco	5	2 (40%)	2 (40%)
Ures	4	0	0

Los porcentajes se determinaron con respecto al número de muestras de cada municipio

Cuadro 6. Porcentajes de muestras positivas por la técnica oficial y por PCR.

TÉCNICA	MUESTRAS POSITIVAS	PORCENTAJE
NOM ^a	10	9.9
PCR ^b	23	22.7

Letras distintas indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

microorganismo se encuentra en mayor proporción que lo reportado cuando se utiliza la técnica oficial.

La adaptación que se realizó a la técnica oficial, utilizando Tween 80 y tripsina durante la homogenización de las muestras, en la etapa de preenriquecimiento selectivo, favoreció la liberación de las bacterias para que éstas aumentaran su concentración en el caldo de cultivo. Esto permitió detectar un mayor número de quesos positivos, sin embargo la PCR resultó más sensible.

La cantidad de muestras positivas por PCR superó más del doble (2.3 veces) a las detectadas por la técnica oficial (Figura 7). Como procedimiento molecular, fue más sensible dado que es capaz de detectar el ADN de células dañadas, estresadas y/o en estado viable no cultivable sin necesidad de preenriquecer las muestras. La bacteria en cualquiera de estos estados conserva sus características patógenas, pero no puede ser detectadas por un procedimiento de cultivo *in vitro* hasta que encuentra las condiciones óptimas para reproducirse. Debido a lo anterior, se considera que la PCR tiene más ventajas desde el punto de vista de salud pública ya que la reversión del microorganismo de un estado viable no cultivable a un estado cultivable, puede suceder durante la elaboración del alimento o en el almacenamiento. En refrigeración la mayoría de las bacteria detienen su crecimiento, siendo menor la competencia por nutrientes para *L. monocytogenes* (Jay, 1994; Allman y col., 1995; Besnard y col., 2000).

Las cepas de *L. monocytogenes* involucradas en brotes de listeriosis por el consumo de alimentos han mostrado la hemólisis en agar sangre de carnero como principal factor de virulencia, por lo que la presencia del gen *hlyA* en su material genético es obvia. Existen cepas mutantes que sufren deleción de este gen (Vázquez-Boland y col., 2001) y no pueden ser detectadas por PCR cuando los iniciadores amplifican una parte de ese segmento de ADN. En este estudio se aislaron 2 cepas no hemolíticas, que fueron caracterizadas bioquímicamente por la utilización de carbohidratos como fermentadoras de dextrosa, esculina, maltosa y ramosa pero por PCR no se logró la amplificación correspondiente.

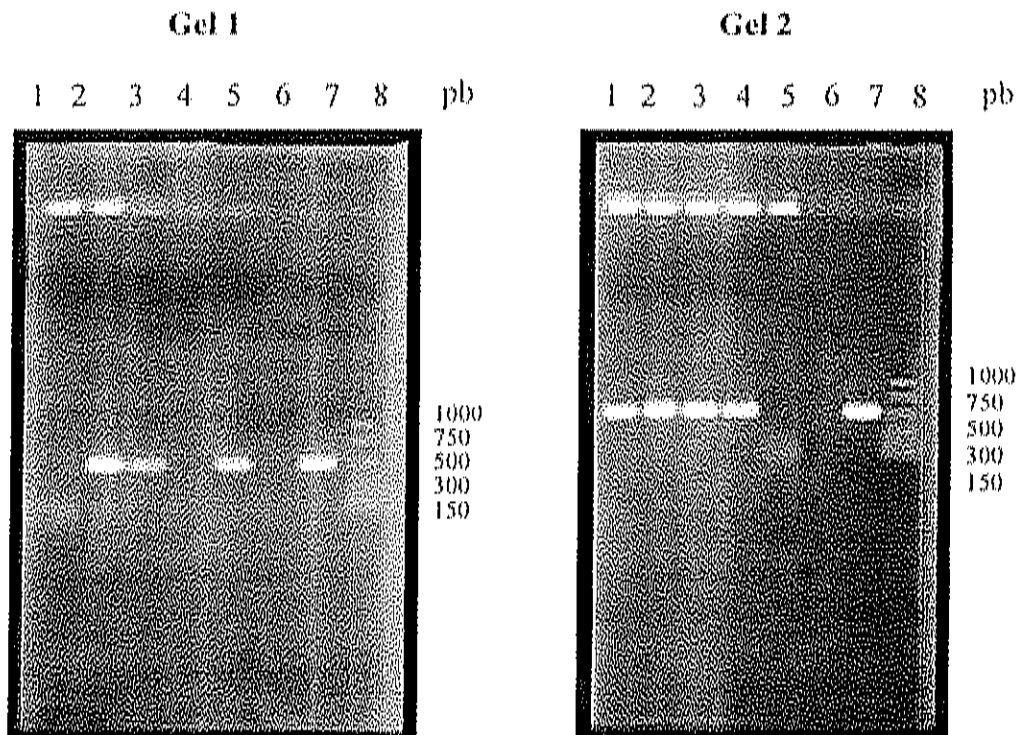


Figura 7. Muestras de queso fresco con reacción de PCR positiva para la detección de *L. monocytogenes* en varios municipios del estado de Sonora.

Gel 1		Gel 2	
CARRIL	MUESTRA	CARRIL	MUESTRA
1	Q1	1	Q6
2	Q2	2	Q7
3	Q3	3	Q8
4	Q4	4	Q9
5	Q5	5	Q10
6	C (-)	6	C (-)
7	C (+)	7	C (+)
8	Marcador de PM	8	Marcador de PM

La NOM-143-SSA1-1995 considera que las cepas no hemolíticas de *L. monocytogenes* no son patógenas. Diversos estudios han demostrado que la especie posee otros factores de virulencia como fosfolipasa C, proteína p60, filamentos de actina, metaloproteasas, catalasa, entre otros (Cooray y col., 1994, Erdenlig y col., 2000). Se ha comprobado la existencia de 133 cepas hemolíticas de *L. monocytogenes*, mientras que en el ADN genómico de 313 cepas está presente el gen *prfA*, que controla la transcripción de algunos factores de virulencia. Dentro de las 313 cepas que expresan este gen, está incluidas las hemolíticas, sin embargo las 180 restantes se deben considerar como potencialmente patógenas por la expresión de otros factores de virulencia. Hasta el momento no se ha logrado establecer una relación entre el origen (alimento, animal, humano) o las características del tipo (variante sérica, ribovar, etc.) y la virulencia de la cepa (Codex Alimentarius, 2001; Raybourne 2002).

La detección de células no viables ha sido controversial, ya que algunos estudios indican que cuando un microorganismo muere, su ADN es degradado por la presencia de ADNasas tanto en la muestra como en la misma célula (Allman y col., 1995). Un estudio realizado con células no viables de *Legionella pneumophila* después de ser expuestas a 70° C por 10 minutos, demostró que no fueron detectadas por PCR, en muestras de agua (Bej y col., 1991). Sin embargo, Josephson y col. (1993), mencionan que el ADN de una bacteria muerta puede protegerse por algunos componentes de la muestra, principalmente material coloidal, pudiendo ser detectado por PCR, incluso, 16 semanas después de la muerte celular. De cualquier manera, los quesos frescos regionales se preparan, en la mayoría de los casos, con leche cruda y durante la elaboración no existe ningún proceso térmico y/o de afeitamiento que elimine la presencia del patógeno. Lo anterior hace más probable que en las muestras positivas por PCR las células de *L. monocytogenes* se encuentren en cualquiera de los estados no cultivables descritos anteriormente.

Por otro lado, además de *L. monocytogenes*, se aislaron dos cepas de *L. innocua*, una de *L. grayi*, una de *L. seeligeri* y dos cepas de *Listeria* no biotipificables (Cuadro 7). Esto significa que el queso está contaminado con más de una especie de *Listeria* y

Cuadro 7. Especies de *Listeria* aisladas de queso fresco del estado de Sonora.

No. de muestras	Especie
8	<i>L. monocytogenes</i> (hemolítica)
2	<i>L. monocytogenes</i> (no hemolítica)
2	<i>L. innocua</i>
1	<i>L. welshimeri</i>
1	<i>L. seeligeri</i>
1	<i>L. grayi</i>
2	<i>Listeria</i> spp

las bacterias pueden provenir del medio ambiente (agua, tierra, paja, etc.), del animal, del lugar de elaboración o venta del producto. Sin embargo, estas especies no se han visto involucradas en brotes de listeriosis, pero son un indicador de la presencia del patógeno, puesto que las condiciones medioambientales de desarrollo óptimas son similares para todo el género bacteriano (Brackett, 1988).

Todas las especies de *Listeria* se detectaron en el periodo de febrero a abril. Durante los meses de mayo a julio no se encontró ninguna bacteria de este género. Un estudio realizado por Jones (1990) menciona que en el Reino Unido la incidencia de listeriosis es más alta durante los meses de frío. Cabe la posibilidad de que durante el verano la temperatura ambiente favorezca el desarrollo de la flora competitiva (mesófilos), inhibiendo el desarrollo de las cepas de *Listeria*, que se encuentran en menor proporción. De este modo, los meses de frío favorecen el desarrollo del patógeno, al disminuir la proliferación de la flora acompañante (Vázquez y col., 2001).

La determinación de especies, por el procedimiento oficial, se llevó a cabo realizando pruebas bioquímicas mediante la prueba de hemólisis, CAMP y fermentación de carbohidratos principalmente. La técnica de PCR detectó exclusivamente *L. monocytogenes*, que es la única especie de importancia desde el punto de vista de salud pública (NOM, 1995).

CONCLUSIONES

La recuperación de *L. monocytogenes* en queso fresco fue inversamente proporcional a la concentración inoculada en la leche, encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las cinco concentraciones de la bacteria (12×10^1 , 12×10^2 , 12×10^3 , 12×10^4 y 12×10^5 UFC/mL).

Mediante la amplificación por PCR, se logró detectar *L. monocytogenes* inoculada en queso fresco, hasta una concentración de 52 UFC/g, utilizando el procedimiento de lisis rápida directamente en las muestras para obtener el ADN.

Utilizando tripsina y Tween 80 para liberar a las bacterias de la matriz alimenticia, no se observó inhibición de la *Taq*polimerasa, por interferencia de los componentes de la muestra durante la detección de *L. monocytogenes* por PCR en quesos frescos.

Se disminuyó el tiempo para detectar *Listeria monocytogenes* en queso fresco, de 13 días por el procedimiento oficial a menos de 24 horas por PCR.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la sensibilidad de la técnica de PCR (23 muestras positivas) y la del procedimiento oficial (10 muestras positivas), resultando la primera 2.3 veces más sensible.

Se aislaron cuatro especies de *Listeria* (diez cepas de *L. monocytogenes*, dos cepas de *L. innocua*, una cepa de *L. welshimeri*, una cepa de *L. seeligeri*) y dos tipos diferentes de *L. monocytogenes* (ocho cepas hemolíticas y dos no hemolíticas).

No se detectaron por PCR cepas de *L. monocytogenes* no hemolíticas, debido a que los iniciadores que se utilizaron amplifican un segmento del gen *hlyA*, que sólo está presente en las cepas hemolíticas.

Utilizar tripsina y Tween 80 durante la homogenización de la muestras en la técnica oficial, permitió una mayor recuperación de la bacteria, aumentando la prevalencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos sonorenses hasta 9.9 %.

Considerando a la PCR como procedimiento de detección, la prevalencia de *L. monocytogenes* en quesos regionales sonorenses aumentó a 22.7 %.

RECOMENDACIONES

Realizar ensayos de patogenicidad *in vitro* e *in vivo* con las cepas de *Listeria* aisladas de queso fresco.

Diseñar iniciadores que amplifiquen fragmentos de ADN presentes en todas las cepas de la especie *L. monocytogenes*, incluyendo a las no hemolíticas.

Tipificar a nivel molecular aquellas especies de *Listeria* que no pudieron ser clasificadas fenotípicamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu W. y Radstrom P. Capacity of Nine Thermostable DNA Polymerases to Mediate DNA Amplification in the Presence of PCR-Inhibiting Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64:3748-3753.
- Acedo E., Díaz M. E. y León A. B. Incidencia de *Brucella* sp. en leche cruda y queso fresco regional. *Alimentaria*, 1997; 4:57-60.
- Alaniz de la O. R. y Morales A. L. J. *Listeria*. Capítulo 27 en Gustavo Lugo de la Fuente. *Bacteriología Médica*. Ediciones Cuéllar; 1998: 5.
- Allman M., Höflein C., Köppel E., Lüthy J., Meyer R., Niederhauser C. y Candrian U. PCR for Detection of Pathogenic Microorganisms in Bacteriological Monitoring of Dairy Products. *Research Microbiology* 1995; 146: 85 – 97.
- Almeida P. F. y Almeida R.C.C. A PCR Protocol Using *inl* Gene as Target for Specific Detection of *L. monocytogenes*. *Food Control* 2000; 11: 97-101.
- Allekruse S., Timbo B., Mowbray J., Bean N. y Potter M. Cheese-Associated Outbreaks of Human Illness in the United States, 1973 to 1992: Sanitary Manufacturing Practices Protect Consumers. *Journal of Food Protection* 1998; 61(10): 1405-1407.
- Arizpe I. y Westhoff D. Manufacture and quality of Venezuelan white cheese. *Journal of Food Science* 1984; 49:1005.
- Aureli P., Fiorucci C., Caroli D., Marchiaro G., Novara O., Leone L. y Salmaso S. An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with corn Contaminated by *L. monocytogenes*. *New England Journal of Medicine* 2000; 342:1236-1241.
- Badui D. S. *Química de los alimentos*. Ed. Alhambra Mexicana. 2da ed. México, D.F. 1990; 582 - 611.
- Bansal N. S. Development of a PCR Assay for the Detection of *L. monocytogenes* in Foods. *Letters in Applied Microbiology* 1996; 22:353 - 356

- Barrera H. A., Ortiz R., Rojas A. y Reséndez D. PCR: Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo* 1993; 108: 50-60.
- Bej A. K., Mahbubani M. H. Y Atlas R. M. Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by PCR and gene probe methods. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57:597-600.
- Besnard V., Federighi M. y Cappelier J. M. Development of a Direct Viable Count Procedure for the Investigation of VBNC State in *L. monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 2000; 31:77 – 81.
- Bessesen M. T., Luo Q., Robart H. A., Blaser M. J. y Ellison III R.T. Detection of *L.monocytogenes* by using the PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1990; 9:2930-2932.
- Bickley J., Short J. K., McDowell D. G. y Parkes H. C. PCR Detection of *L. monocytogenes* in Diluted and Reversal of PCR Inhibition Caused by Calcium Ions. *Letters in Applied Microbiology* 1996; 22:153 – 158.
- Brackett Robert. Presence and Persistence of *L. monocytogenes* in Food and Water. *Food Science and Technology*. 1988; 42:162-164.
- Boggs J. D., Whitwam R. E., Hale L. M., Briscoe R. P. y Kahn S. E. Outbreak of Listeriosis Associated With Homemade Mexican-Style Cheese – North Carolina, October 2000-January 2001. *Morbidity and Mortality Weekly Reports* 2001; 50:560-562.
- Border P. M., Howard J. J., Plastow G. S. y Siggins K. W. Detection a *Listeria* species and *L. monocytogenes* using PCR. *Letters in Applied Microbiology* 1990; 11:158-162.
- Brouillaud A., Maire M., Collete C., Mattei C. y Lahellec C. Predictive Microbiology of Dairy Products: Influence of Biological Factors Affecting Growth of *Listeria monocytogenes*. *Journal of AOAC International* 1997; 80: 913-919.
- Bubert A., Kohler S. y Goebel W. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus-and species-specific identification of *Listeria spp.* by PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; 58:2625-2632.

- Bubert A., Hein I., Rauch M., Lehner A., Yoon B., Goebel W. y Wagner M. Detection and Differentiation of *Listeria spp.* by a Single Reaction Based of Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 65:4688-4692.
- Buyser M.L., Dufour B. y Lafarge V. Implication of Milk and Milk Products in Food-Borne diseases in France and different industrialised countries. *International Journal of Food Microbiology* 2001; 67: 1-17.
- Caballero J., Valpuesta V. y Muñoz J. "Fingerprinting" mediante marcadores moleculares en biotecnología: descripción, aplicaciones y perspectivas. <http://webcd.usuai.es/web/transgen00/unidades/document01/caballero/cap7.htm> . Acceso en marzo 2002.
- CDC. Multistate Outbreak of Listeriosis - United States, 2000. *JAMA* 2001; 285:285-286.
- Centro de Estadística Agropecuaria (CEA). Boletín bimestral de la leche. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, México 1999.
- Citti R., Scaramelli A. y González I. Aislamiento de *L. monocytogenes* en Muestras de Queso Blanco Duro Tipo Llanero del Distrito Sanitario Uno del Estado Aragua, Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 1999; 40:101-110.
- Comisión del Codex Alimentarius. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Informe de la 34ª reunión del Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos. Bangkok, Tailandia. 8 - 13 de octubre de 2001.
- Cooray K. J., Nishibori T., Xiong H., Matsuyama T., Fujita M. y Mitsuyama M. Detection of Multiple Virulence-Associated Genes of *L. monocytogenes* by PCR in artificially Contaminated Milk Samples. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 8:3023-3026.
- Cordano A. y Rocourt J. Occurrence of *L. monocytogenes* in Food in Chile. *International Journal of Food Microbiology* 2001;70:175-178.
- Cossart P., Vicente M. F., Mengaud J., Baquero F., Pérez -Díaz J. y Berche P. Listeriolysin O Is Essential for Virulence of *L. monocytogenes*. *Infection and Immunity* 1989; 57:3629-3636.

- Dalton C., Med B., Austin C., Sobel J., Hayes P., Bibb W. y col. An Outbreak of Gastroenteritis and Fever Due to *L. monocytogenes* in Milk. *The New England Journal of Medicine*. 1997; 336:100-105.
- De León L., Florence T. y Sánchez C. Adaptación y Transferencia de Tecnología para Mejorar la Calidad Sanitaria del Queso Artesanal en Guatemala. INCAP Guatemala. <http://www.condesan.org/arracacha/air2florence.htm>. Acceso en noviembre 2001.
- Delgado da Silva M. C., Destro M. T., Hofer E. y Tibana A. Characterization and Evaluation of Some Virulence Markers of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Brazilian Cheeses Using Molecular, Biochemical and Serotyping Techniques. *International Journal of Food Protection* 2001; 63:275-280.
- Delgado da Silva M. C., Hofer E. y Tibana A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Cheese Produced in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Food Protection* 1998; 61: 354-356.
- Denner H. G. y Boychuk I. Species specific detection of *Listeria monocytogenes* by DNA amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 1999; 2:606-609.
- Diario Oficial de la Federación. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de actividades, establecimientos, productos y servicios. 1988. Organismo del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos.
- Díaz C. M. E., Acedo F. E. y León D.A.B. Survival of *Brucella abortus* in the Mexican white soft cheese processing. *Recent Research Development In Nutrition Research* 1998a; 2:47-57.
- Díaz C. M. E., Acedo F. E. y Silveira A. M. Survival and recovery of *Brucella melitensis* in Mexican White Soft Cheese Processing. *Recent Research Development Microbiology*. 2000; 4:529-535.
- Díaz C. M. E., Armenta R., Fraijo O., Acedo F. E., González E. y Lozano T. Determination of sanitary, chemical quality and amines production in Mexican white soft cheese and Chihuahua style cheese. *Recent Research. Development In Nutrition Research*. 1998b; 2:59-67.

- Dickinson J. H., Kroll R. G. y Grant K. A. The direct application of the PCR to DNA extracted from food. *Letters in Applied Microbiology* 1995; 20:212-216.
- Dieffenbach Carl W., Lowe T. y Dveksler G. General Concepts for PCR Primer Design. *PCR Methods Applied* 1993; 3:30-37.
- Encinas J. P. Validación de Métodos Microbiológicos. Técnicas Rápidas y Automatizadas en Microbiología de Alimentos. Universidad de León. León, España. 1997:i-xii.
- Erdenlig Sevil, Jerald A. A., y Austin Frank W. Pathogenicity and Production of Virulence Factors by *L. monocytogenes* Isolates from Channel Catfish. *Journal of Food Protection* 2000; 63:613 – 619.
- Eskin N. A. M., Henderson H. M. y Townsend R. J. *Biochemistry of Foods*. Ed. Academic Press. Nueva York, E.U.A. 1971: 126 – 128.
- Farber J. M. y Peterkin P. I. *Listeria monocytogenes*, a Food - Borne Pathogen. *Microbiological Reviews* 1991; 55:476-511.
- FIRA. Industria de lácteos en México. Disponible en línea http://www.fira.gob.mx/Boletines/boletin009_06.pdf. Acceso octubre de 2001.
- Fitter S., Heuzenroeder M. y Thomas C. J. A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *L. monocytogenes*. *Journal of Applied Bacteriology* 1992; 73:53-59.
- Fleming D. W. Pasteurized milk as vehicle of infection in a outbreak of listeriosis. *New England Journal Medical* 1985; 312:404-407.
- Fluit A.C., Torensma R., Visser M. J. C., Aarsman C. J. M., Poppelier M. J., y col. Detection of *L. monocytogenes* in Cheese with the Magnetic Immuno-PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; 59:1289-1293.
- Fox P. F. *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*. 1987. Ed. Elsevier Applied Science. 1987. New York, USA. 345-352.
- Fox P. F. y McSweeney P. L. H. *Dairy Chemistry and Biochemistry*. Ed. Blackie academic y professional. Londres, Inglaterra 1998: 146-186.

- Franciosa G., Tartaro S., Wedell-Neergaard C. y Aureli P. Characterization of *Listeria monocytogenes* Strains Involved in Invasive and Noninvasive Listeriosis Outbreaks by PCR-Based Fingerprinting Techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 2001; 67:1793-1799.
- García A. S., Díaz C. Martha E., Avilés A. M. y Mata H. V. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco de Sonora utilizando perlas inmunomagnéticas y Norma Oficial Mexicana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 2000; 42:651.
- Gellin B. G. y Broome C. V. Listeriosis. *JAMA* 1989; 261:1313 - 1318.
- Gibbs R. A. y Chamberain J. S. The Polymerase Chain Reaction: a meeting report. *Genes and Development* 1989; 3:1095-1098.
- Glaser P., Frangeul L., Buchrieser C., Rusniok C., Amend A., Baquero F., Berche P., Bloecker H., Brandt P., Chakraborty T. y col. Comparative Genomics of *Listeria* Species. *Science* 2001; 294:849-852.
- Golsteyn T. E., King R. K., Burchak J. y Gannon V. P. Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the Polymerase Chain Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 1991; 57:2576-2580.
- Gunnar P., Tjerneld F., Borch E., Hahn B. y Radstrom P. Enhanced Sensitivity in Polymerase Chain Reaction Detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese through Use of an Aqueous Two-Phase System as a sample Preparation Method. *Applied and Environmental Microbiology* 1994; 60:3416-3418.
- Harris L. J. y Griffiths M. W. The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain reaction. *Food Research International* 1992; 25:457-469.
- Herler M., Bubert A., Goetz M., Vega Y., Vázquez-Boland J. y Goebel W. Positive Selection of Mutations Leading to Loss or Reduction of Transcriptional Activity of PrfA, the Central Regulator of *Listeria monocytogenes* Virulence. *Journal of Bacteriology* 2001; 183:5562-5570.

- Herman L. M., DeBlock J. H. y Moermans R. J. Direct Detection of *Listeria monocytogenes* in 25 ml of raw milk by a Two step Polymerase Chain Reaction with Nested Primers. *Applied and Environmental Microbiology* 1995; 2:817-819.
- Herman L. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiology* 1997; 14:103-109.
- Hill W. E. The Polymerase Chain Reaction: Applications for the detection of Foodborne Pathogens. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1996; 36:123-173.
- Huerta Elmer. Advierten sobre el Peligro de Consumir Queso Fresco. Serie en línea. <http://www.prevencion.org/press/articles/sep-1-1999-1310.html>. Acceso en Mayo de 2001.
- IFST. IFST POSITION STATEMENT Food safety and cheese. *Food Science and Technology Today* 1998; 12:117-122.
- Jay J. M. *Microbiología moderna de los alimentos*. Ed. Acribia. 3era ed. Zaragoza, España 1994; 601-639.
- JMP. Stastical Analysis System. JMP. Guiders lines. Versión 3.1.1. 1994. SAS Institute. USA.
- Johansson T., Ahola L.H., Pirhonen T., Taimisto A.M., Haario H., Laine M., y Salkinoja S.M. Improved detection of *Listeria monocytogenes* in soft mould-ripened cheese. *Journal of Applied Microbiology*. 2000; 88:870-876.
- Jones D. Foodborne Illness. *The Lancet* 1990; 336: 1171 - 1174.
- Josephson K. L., Gerba C. P. y Pepper I. L. PCR Detection of Nonviable Bacterial Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 1993; 59:3513-3515.
- Klein P. G. y Juneja V. Sensitive Detection of Viable *L. monocytogenes* by Reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63:4441-48.
- Kosikowski V. F. *Cheese and Fermented Milk*. F. V. Kosikowski y asoc. Brooktondale, N.Y., U.S.A. 1982:10-15.
- Kozak J., Balmer T., Byrne R. y Fisher K. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Foods; Incidence in Dairy Products. *Food Control* 1996; 7: 215-221.

- Lovett J. Isolation and Enumeration of *L. monocytogenes*. Food Technology 1988; 42:172-175.
- Luis Juan M.A. *L. monocytogenes* en productos lácteos y su importancia en salud pública. Tesis de Maestría. CUCEI. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal., Méx. 1994.
- Luis Juan M. A., Alaniz de la O R. y Soltero I. E. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* durante la elaboración y almacenamiento de queso adobera. Memorias 3er Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos. XVIII Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Noviembre 2001. Guadalajara, Jalisco.
- Lund B., Baird P. T., y Gould G. *Listeria monocytogenes* en: The Microbiological Safety and Quality of Food. Cap. 44. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. 1178-1232.
- Mafu A., Denis R., Goulet J. y Savoie L. Characterization of Physicochemical Forces Involved in Adhesion of *Listeria monocytogenes* to Surfaces. Applied and Environmental Microbiology 1991; 57:1969-1973.
- Makino S. I., Okada Y. y Murayama T. A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR. Applied and Environmental Microbiology 1995; 10:3745-3747.
- Mantynen Vesa. Detection and Characterization of Food Related Microorganisms Using Molecular and Physiological Methods. Tesis Doctoral. Department of Applied Chemistry and Microbiology University of Helsinki. Helsinki, Finlandia 1999.
- Manzano M., Cocolin L., Cantoni C. y Comi G. Detection and Identification of *Listeria monocytogenes* in Food by Polymerase Chain Reaction and Oligonucleotide-Specific Capture Plate Hybridization. Food Microbiology 1998. 15: 651 - 657.
- Martínez V. I. Curso Taller: Fundamentos básicos del PCR y su aplicación en el diagnóstico. Manual editado por Unidad de Desarrollo en Biología celular y Molecular, convenio UANL-INIFAP 1998; 8, 10-13, 20-21.

- Meng J. y Doyle M. Emerging issues in microbiological food safety. *Annual Reviews in Nutrition* 1997; 17:255-275.
- Mengaud J., Vicent M., Chenevert J., Pereira J., Geoffrey C., Gicquel - Sanzey B. y col. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *L. monocytogenes*. *Infection and Immunity* 1988; 56:766-772.
- Murray R. G. E., Willis A. W. y Noel R. K. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. Philipp Gerhardt Editores. Washington D.C., E.U.A. 1994: 76-79.
- Niederhauser C., Candrian U., Hofelein C., Jermini M., Buhler P. y Luthy J. Use of PCR for Detection of *L. monocytogenes* in Food. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; 5:1564-1568.
- Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. <http://www.secofi.gob.mx>. Marzo 2001.
- Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995. Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. <http://www.secofi.gob.mx>. Octubre 2000.
- Norma Oficial Mexicana NOM-092-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa. <http://www.secofi.gob.mx>. Marzo 2001.
- Norton D. M. PCR – Based Methods for Detection of *L. monocytogenes*: Toward Real-Time Screening for Food and Environmental Samples. *Journal of AOAC International* 2002; 85:505-515.
- Norrung B. Microbiological Criteria for *L. monocytogenes* in Foods Under Special Consideration. *International Journal Food Microbiology* 2000; 62:217-223.
- Organización Panamericana de la Salud. <http://www.paho.org/spanish/HIA1998/Mexico.pdf>. Acceso Enero 2002.
- Oteo J. y Alós J. I. *Listeria* y listeriosis. Serie en línea 2000. 5pp. http://192.168.100.2/control/revi_Bacte/listeria.htm.
- Pinner R. W., Schchat A., Swaminathan B., Hayes S., Deaver K., Weaver R. y col. Role of Foods in Sporadic Listeriosis. *JAMA* 1992; 267:2046-2050.

- Powell H. A., Gooding C. M., Garrett S. D., Lund B. M. y McKee R. A. Proteinase inhibition of the detection of *L. monocytogenes* in milk by PCR. Letters in Applied Microbiology 1994; 18:59-61.
- Raybourne R. B. Virulence Testing of *L. monocytogenes*. Journal of AOAC International 2002; 85:516-523.
- Ripio M., Domínguez-Bernal G., Suárez M., Brehm K., Berche P. y Vázquez-Boland J. Transcriptional Activation of Virulence Genes in Wild-Type Strains of *L. monocytogenes* in Response to a Change in the Extracellular Medium Composition. Research Microbiology 1996; 147:371-384.
- Robinson R. K. y Wilbey R. A. Cheesemaking practice. Aspen publications. 3th ed. Gaithersburg, Maryland 1998: 10-29.
- Rodas S. O., Pedroche J., Betancourt R. J., Quiñones R. E. y Vázquez S. C. Determinación de algunos factores de virulencia de *L. monocytogenes* aislada de leche y germinados. Memorias 3er Congreso Internacional de Inocuidad de Alimentos XVIII Reunión Nacional de Microbiología Higiene y Toxicología de los Alimentos. Noviembre 2001. Guadalajara, Jalisco, México.
- Rodu B. Molecular biology in medicine the PCR: The revolution within. The American Journal of the Medical Sciences 1990; 299:210-216.
- Rossen L., Nørskov P., Holstrøm K y Rasmussen O. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA - extraction solutions. International Journal of Food Microbiology 1992; 17:37-45.
- Ruíz O. P., Lugo de la F. G. y Curiel Q. E. Detección de *Listeria monocytogenes* en líquido cefalorraquídeo mediante PCR. Procedente del XXIX Congreso Nacional de Microbiología; 1998 Jun 8-10; Oaxtepec, Morelos: 93.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T. y col. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 1988; 239:487-491.
- Scheu P., Berghof K. y Stahl U. Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the PCR. Food Microbiology 1998; 15:13-31.

- Schlech Walter. *Listeria* Gastroenteritis – Old syndrome, New pathogen. The New England Journal of Medicine. 1997; 336:130-132.
- Soo Ha Kwang, Ja Park Seon, Jae Seo Sook, Hyun Park Jung y Hwa Chung Duck. Incidence and PCR Assay of *L. monocytogenes* from Raw Milk in Gyeongnam Province of Korea. Journal of Food Protection 2002; 65: 11 – 115.
- Southern E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. Journal of Molecular Biology 1979; 98:503-517.
- Starbuck M. A. B., Hill P. J. y Stewart G. S. A. B. Ultra sensitive detection of *L. monocytogenes* in milk by the PCR. Letters in Applied Microbiology 1992; 15:248-252.
- Steffan R. J. y Atlas R. M. PCR: Applications in Environmental Microbiology. Annual Reviews in Microbiology 1991; 45: 137-161.
- Swaminathan Bala. Rapid Detection of Food-Borne Pathogenic Bacteria. Annual Reviews Microbiology 1994; 48:401-426.
- Valencia J. M. E., Hoyos L., Ballesteros M. N., Ortega M. I., Palacios M. y Atondo J. La dieta en Sonora: canasta de consumo de alimentos. Estudios Sociales 1998; VIII:10-39.
- Vázquez - Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez - Bernal G., Goebel W., González-Zorn, Wehland J. y Kreft J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. Clinical Microbiology Reviews 2001; 14: 584-640.
- Vázquez S. C., Rodas S. O. y Quiñones R. E. I. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. Food Microbiology 2001; 18: 177-181.
- Veyrat A., Miralles M. C. y Pérez M.G. A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. Journal of Applied Microbiology 1999; 87:49-61.

- Vines A. y Swaminathan B. Identification and Characterization of Nucleotide Sequence Differences in Three Virulence-Associated Genes of *L. monocytogenes* Strains Representing Clinically Important Serotypes. *Current Microbiology* 1998; 36:309-318.
- Walstra P., Geurts T. J., Noomen A., Jellema A. y van Boekel M. A. J. S. *DAIRY TECHNOLOGY Principles of Milk Properties and Processes*. Ed. Marcel Dekker, Inc. USA 1999: 658-668.
- Wernars K., Heuvelman C. J., Chakraborty T. y Notermans S. H. W. Use of the Polymerase Chain Reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 1991; 70:121-126.
- Wesley I., Harmon K., Dickson J. y Schwartz A. Application of a Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for the Simultaneous Confirmation of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* species in Turkey Sample Surveillance. *Journal of Food Protection* 2002; 65:780-785.
- Williams J. R., Thayullathil C. y Freitag N. Sequence Variations within PrfA DNA Binding Sites and Effects on *Listeria monocytogenes* Virulence Gene Expression. *Journal of Bacteriology* 2000; 182: 837-841.
- Wolcott M. J. DNA-Based Rapid Methods for the Detection of Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection* 1991; 54:387-401.