UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS

"Frecuencia, nivel de contaminación y comportamiento de *Listeria* en queso fresco adobera"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
M. en C. ANGÉLICA LUIS JUAN MORALES

DIRECTOR:
Dra. María del Refugio Torres Vitela
ASESORES:
Dr. Agustín Ramírez Álvarez
Dr. Efraín Pérez Torres

Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., Diciembre del 2001

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
COORDINACION DE POSGRADO

COORDINACIÓN DE POSGRADO DE LA
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por éste conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló la pasante de Doctorado en el Posgrado Interinstitucional en Ciencias Pecuarias de la Universidad de Guadalajara, M en C Angélica Luis Juan Morales, cuyo titulo es:

"Frecuencia, nivel de contaminación y comportamiento de *Listeria* en queso fresco adobera".

Trabajo dirigido por: Dra. Ma. Refugio Torres Vitela

Los que suscriben la presente avalan esta versión, la cual fue revisada y reúne los requisitos teóricos y metodológicos necesarios.

ATENTAMENTE
Las Agujas, Nextipac, Zapopan, Jal. a 1 Noviembre del 2001

REVISOR
DR. DANIEL A. F. VILLAGOMEZ ZAVALA

REVISOR
DR. AGUSTIN RAMIREZ ALVAREZ

REVISOR
DR. EFRAIN PEREZ TORRES

REVISOR
DR. HUGO CASTAÑEDA VAZQUEZ

REVISOR
DR. JACINTO BAÑUELOS PINEDA

c.c.p. Archivo

Frecuencia, nivel de contaminación y comportamiento de *Listeria* en queso fresco adobera

INDICE

		Página
	INDICE DE CUADROS	ii
	INDICE DE FIGURAS	iii
	ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	vi
	RESUMEN	ix
1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEORICO	8
	Historia de la enfermedad	9
	Incidencia de la Listeriosis: Morbilidad y Mortalidad	10
	Impacto económico de la Listeriosis	12
	Clasificación	13
	Características del género *Listeria*	14
	Características de la enfermedad	21
	Epidemiología	25
	El queso adobera	57
3.	JUSTIFICACIÓN	60
4.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS	62
5.	MATERIALES Y METODOS	65
	ETAPA 1.-Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso freso adobera elaborado con leche pasteurizada que se vende en tiendas de autoservicio	66
	Muestreo	66
	Aislamiento e identificación de *Listeria*	67
	ETAPA 2.-Nivel de contaminación por *Listeria* queso adobera positivo a la presencia del microorganismo.	76
	ETAPA 3.- Comportamiento de una cepa nativa de *Listeria monocytogenes* y cambios concurrentes en la flora láctica, pH y acidez titulable, durante la fabricación y el almacenamiento del queso adobera.	80
	Materias primas	80
	Cultivos microbianos	80
	Diseño del experimento	80
	Recuentos microbianos	83
	Determinación de acidez titulable y pH	86
	Análisis estadístico	89
6.	RESULTADOS	90
	ETAPA 1	91
	ETAPA 2	99
	ETAPA 3	99
7.	DISCUSIÓN	120
	ETAPA 1	121
	ETAPA 2	126
	ETAPA 3	127
8.	CONCLUSIONES	134
9.	BIBLIOGRAFÍA	137
10.	ANEXO	157

INDICE DE CUADROS

No.	TÍTULO	Página
1.	Pruebas empleadas en la diferenciación de las especies de *Listeria*	18
2.	Serotipos de *Listeria*	19
3.	Tipos de Listeriosis humana	26
4.	Brotes de Listeriosis transmitidos por alimentos	30
5.	Casos esporádicos de Listeriosis transmitidos por alimentos	36 y 37
6.	Dosis mínima infecciosa y periodo de incubación en Listeriosis transmitida por alimentos.	38
7.	Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche	42
8.	Incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos	45
9.	Niveles de *Listeria monocytogenes* en quesos blandos	47
10.	Sobrevivencia y/o desarrollo de *L. monocytogenes* en productos lácteos	48
11.	Distribución del queso adobera estudiado según su presencia en los sitios de muestreo	68
12.	Diferenciación de las especies de *Listeria*	77
13.	Diferenciación de especies de *Listeria* y organismos relacionados comúnmente referidos como *Listeria*	78
14.	Programa de elaboración del queso adobera	84
15.	Frecuencia de *Listeria* en queso adobera según distribución de marcas en sitios de muestreo	96
16.	Positividad a *Listeria* por marcas de queso adobera que se expenden en tiendas de autoservicio de la ZMG	97
17.	Eficacia de los medios de aislamiento y del tiempo de incubación del caldo de enriquecimiento en la recuperación de *Listeria* en queso adobera	98
18.	Niveles de contaminación con *Listeria* y su frecuencia en queso pasteurizado adobera	101
19.	*Listeria monocytogenes*, lácticos, pH y acidez en queso adobera	102

INDICE DE FIGURAS

No.	TITULO	Página
1.	Microfotografía electrónica de *Listeria monocytogenes*	15
2.	Ciclo hipotético de infección por *Listeria monocytogenes*	28
3.	Procedimiento FDA para aislamiento de *L. monocytogenes* de alimentos	69
4.	Iluminación oblicua de Henry	71
5.	Identificación de *Listeria*	73
6.	Prueba de CAMP	75
7.	Recuento de *Listeria* por siembra directa en placa	79
8.	Determinaciones durante la fabricación y almacenamiento del queso adobera	82
9.	Preparación del inoculo	85
10.	Recuento de *Listeria monocytogenes* por siembra directa en placa	87
11.	Frecuencia de *Listeria* en queso adobera que se expende en tiendas de autoservicio de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Procedimiento FDA.	92
12.	Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso adobera que se expende en tiendas de autoservicio de la Zona Metropolitana de Guadalajara. Procedimiento FDA.	93
13.	Frecuencia de especies de *Listeria* aisladas de queso adobera que se expende en tiendas de autoservicios de la Zona Metropolitana de Guadalajara.	94
14.	Distribución de aislamientos de *Listeria* únicos o combinados a partir de queso adobera que se expenden en tiendas de autoservicio de la Zona Metropolitana de Guadalajara.	95
15.	Rangos de pH y Desviación Estándar en muestras de queso adobera de tiendas de autoservicio de la Zona Metropolitana de Guadalajara, estudiadas y positivas a *Listeria*	100
16.	Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633 durante la elaboración de 4 lotes de queso adobera	103

17. Comportamiento y Desviación Estándar de *Listeria monocytogenes* 1633 durante la elaboración de queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de cuatro experimentos. 104

18. *Listeria*, lácticos, acidez y pH durante la elaboración de queso adobera con leche contaminada con *Listeria monocytogenes* 1633. Experimento 1 106

19. *Listeria*, lácticos, acidez y pH durante la elaboración de queso adobera con leche contaminada con *Listeria monocytogenes* 1633. Experimento 2 107

20. *Listeria*, lácticos, acidez y pH durante la elaboración de queso con leche contaminada con *Listeria monocytogenes* 1633. Experimento 3 108

21. *Listeria*, lácticos, acidez y pH durante la elaboración de queso con leche contaminada con *Listeria monocytogenes* 1633. Experimento 4 109

22. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, pH y acidez durante la fabricación del queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de cuatro experimentos. 110

23. *Listeria monocytogenes* 1633 durante el almacenamiento en refrigeración de cuatro lotes de queso adobera. 112

24. Comportamiento y Desviación Estándar de *Listeria monocytogenes* 1633 durante el almacenamiento en refrigeración de queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de 4 experimentos. 113

25. *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, acidez y pH durante el almacenamiento de queso adobera en refrigeración por 22 días a 4° C. Experimento 1. 114

26. *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, acidez y pH durante el almacenamiento de queso adobera en refrigeración por 22 días a 4 °C. Experimento 2 115

27. *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, acidez y pH durante el almacenamiento de queso adobera en refrigeración por 22 días a 4 °C. Experimento 3 116

28. *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, acidez y pH durante el almacenamiento de queso adobera en refrigeración por 22 días a 4 °C. Experimento 4 117

29. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, pH y acidez durante el almacenamiento por 22 días a 4 °C del queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de cuatro experimentos. 118

30. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, pH y acidez durante la fabricación y el almacenamiento del queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de cuatro experimentos. 119

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

ADN	Ácido desoxirribonucléico
ARNr	Ácido ribocucléico ribosomal
APN	Agar Actidiona-Polimixina-Nitrito
NACMCF	The National Advisory Commitee on Microbiological Criteria for Foods
CDC	Center for Diseases Control
ASTEL	Agar de Soya y Tripticasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
cel	Células
SSA	Secretaría de Salud
EUA	Estados Unidos de Norteamérica
FDA	Food and Drugs Administration
NOM	Norma oficial mexicana
G	Gramos
NaoH	Hidróxido de sodio
H	Horas
Seg	Segundo
log	Logaritmos
°C	Grados centígrados
<	Menor que
mg	Miligramos

ml	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
ppm	Partes por millón
N	Normal
P	Probabilidad
H_2S	Acido sulfhídrico
°F	Grados Fahrenheit
TSI	Triple azúcar y Hierro
ufc	Unidades Formadoras de Colonias
VP	Vaciado en Placa
pH	Potencial de hidrógeno
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
CEL	Caldo enriquecimiento *Listeria*
OXA	Agar Oxford
UVM	Caldo Universidad de Vermont
LMM	Agar *Listeria* MacBride Modificado
LPM	Agar cloruro de litio-feniletanol moxalactam
AVJM	Agar Vogel Jonson modificado
MOX	Medio de Oxford Modificado
CST	Caldo soya tripticasa
LCR	Reacción en cadena de la ligasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
NASBA	Secuenciación de ácidos nucléicos

HACCP	Sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos
GMP	Buenas Prácticas de Manufactura
ZMG	Zona metropolitana de Guadalajara
d	Días
ASTELSO	Agar soya tripticasa extracto de levadura sangre de ovino
SIM	Medio indol movilidad
CA	California
SPSS	Paquete estadístico para las ciencias sociales
cm^2	Centímetros cuadrados
Kg	Kilogramo
N	Normal
LD_{50}	Dosis letal 50
DE	Desviación estándar
IC	Intervalo de confianza
r	Correlación

RESUMEN

Los productos lácteos juegan un importante papel en la epidemiología de la listeriosis. Diversos brotes de la enfermedad (incluso dos de los brotes mas grandes en los años ochenta) han estado relacionados al consumo de queso contaminado. El objetivo de este estudio fue evaluar la participación del queso fresco adobera como vehículo de *Listeria*, mediante la determinación de la frecuencia, nivel de contaminación y el comportamiento de una cepa nativa de *L. monocytogenes* así como los cambios concurrentes en la flora láctica, pH y acidez titulable, durante la elaboración y almacenamiento del producto. Se obtuvieron 106 muestras del queso en tiendas de autoservicio de la zona metropolitana de Guadalajara. En el aislamiento e identificación del patógeno se empleó la técnica de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos, el procedimiento incluyó un enriquecimiento de 25 g de la muestra en caldo de enriquecimiento para *Listeria* (CEL), aislamiento en medio de Oxford Modificado (MOX) y Agar feniletanol-cloruro de litio-moxalactam (LPM) e identificación bioquímica del género y especie. El nivel de contaminación de *Listeria* se determinó por la técnica de Siembra Directa en Placa en medio MOX, en 28 de las muestras que resultaron positivas. El comportamiento de *L. monocytogenes* 1633 y los cambios concurrentes de la flora láctica, pH y acidez titulable, se estudiaron en el queso adobera durante su elaboración y almacenamiento a 4 °C por 22 días. El queso se fabricó con leche pasteurizada inoculada en el laboratorio con $2.5x10^4$ ufc de *L. monocytogenes*/ml de leche. El recuento de *Listeria* y bacterias lácticas fue mediante Siembra Directa en Agar Vogel Johnson modificado y APN respectivamente, el pH potenciométrico y la acidez por titulación (expresada en % de ácido láctico). En el análisis estadístico se aplicó la Correlación (r) de Pearson y se analizó con el programa de cómputo SPSS V. 7.0. El 38.6 % fueron positivas a *Listeria* y el 16 % correspondieron a *Listeria monocytogenes.* Se recuperó además *L. innocua, L. welshimeri, L. seeligeri* y *L. grayi* en 25.4 %, 4.7 %, 3.7 % y 0.9 % de las muestras, respectivamente. Los límites de pH de las muestras positivas a *Listeria* oscilaron entre 4.41 y 6.23. Los niveles de contaminación con *Listeria* en los quesos adobera oscilaron entre <100 y $3.7x\ 10^5$ ufc/g con una mediana de 200 ufc/g. Respecto al destino de *L. monocytogenes* en queso adobera, a partir de leche inoculada (4.5 log), se observaron incrementos de 0.1 log de ufc de *L. monocytogenes*/g o ml en cuajada recién obtenida, 1.3 al final de la chedarización y 3.1 (mas de mil veces) al final del prensado (producto terminado). Cuando el queso se almacenó en refrigeración 4 °C por 22 días, *L. monocytogenes* 1633 aumentó 3.1, 3.1, 3.7 y 3.5 log a los 0, 8, 15 y 22 días respectivamente. Los resultados indican que el queso adobera, a pesar de estar elaborado con leche pasteurizada (según la etiqueta del fabricante) y comercializado en sitios con recursos que permiten un manejo higiénico, es un substrato adecuado para el desarrollo de *L. monocytogenes*. La alta frecuencia del patógeno en queso adobera y la capacidad del microorganismo para multiplicarse en este substrato, lo evidencian como un vehículo importante de *L. monocytogenes* y un riesgo potencial a la salud, sobre todo para la población susceptible.

1. INTRODUCCION

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, la listeriosis se ha convertido en un problema de Salud Pública y los alimentos de origen animal participan de manera importante como vehículo del germen causal.

La listeriosis es una enfermedad zoonótica bacteriana de distribución mundial causada por *Listeria monocytogenes* y que afecta a una amplia variedad de animales, así como al hombre (Bowmer *et al.*, 1979).

La enfermedad está dejando de ser rara en el mundo y su incidencia parece estar aumentando a nivel mundial, con un especial incremento en el número de casos en Europa (Farber y Peterkin, 1991). En México en 1981 se conocían únicamente 16 casos de la enfermedad (Barriga *et al.*, 1981).

En numerosos países se han logrado importantes avances en el conocimiento de este problema, en nuestro país, éste aún es muy precario debido en parte a que se considera que la enfermedad raramente se presenta, no es obligatorio su reporte, no se hace una búsqueda específica del microorganismo en casos sospechosos, aunque siempre que se ha investigado se ha logrado aislar (Barriga *et al.*, 1981) y, aunado a esto, existen muy pocos estudios sobre su frecuencia y comportamiento en los alimentos.

A pesar de estar subestimada, la listeriosis se ha asociado en otros países con un importante costo económico, generado por los gastos relacionados con la enfermedad, muertes, productividad y con los ocasionados a la industria de alimentos (NACMCF, 1991). En los Estados Unidos de Norteamérica (EUA) en 1989 se reportó que el costo a la industria láctea, solo por decomisos de alimentos contaminados, había ya rebasado los 66 millones de dólares (Buazzi *et al.*, 1992).

Las manifestaciones clínicas de la listeriosis son muy variadas y van desde leves como un tipo de influenza, hasta meningitis y aborto. La enfermedad se ha observado con mayor frecuencia en embarazadas, recién nacidos, ancianos y personas inmunosuprimidas (Schuchat *et al.*, 1991), aunque casos de personas sin tales condiciones predisponentes han sido reportados (Farber y Peterkin, 1991).

La listeriosis en sus formas más severas, se caracteriza por una letalidad alta, ya que a nivel mundial se ha calculado entre 13 y 34% (Farber y Peterkin, 1991), en los grandes brotes se ha estimado cercana al 30% (Pearson y Marth, 1990), y solo en tres de los brotes por productos lácteos se reportaron cerca de 100 muertes (Farber y Peterkin, 1991).

Aunque desde hace muchos años se sospechaba que la listeriosis se podía adquirir por el consumo de alimentos contaminados con la bacteria, no fue sino hasta en la década de los años ochenta, cuando esta vía de transmisión fue plenamente reconocida (Hird, 1987). Los brotes y casos esporádicos de listeriosis ocurridos en América del Norte y Europa y que fueros asociados epidemiológicamente al consumo de ensalada de col, leche pasteurizada, quesos blandos, leche cruda y paté, entre otros, dejaron claro el papel de *L. monocytogenes* como un patógeno transmitido por alimentos (Farber y Peterkin, 1991; Fleming *et al.*, 1985; Gilbert *et al.*, 1993; James *et al.*, 1985; Schlech *et al.*, 1983; Schuchat *et al.*, 1991).

Estudios realizados en diversas partes del mundo como consecuencia de los brotes ya mencionados, han mostrado que la bacteria puede ser encontrada en diversos alimentos crudos y procesados y que puede sobrevivir y aún desarrollar en muchos de ellos (Farber y Peterkin, 1991; NACMCF, 1991).

Listeria esta ampliamente distribuida en el medio ambiente y presenta diversos factores de resistencia a agentes físicos y químicos

(Doyle y Schoeni, 1987a; Doyle *et al.*, 1987b; Yousef y Marth, 1988), que le ofrecen ventajas de sobrevivencia en relación con otros microorganismos en los alimentos, lo que representa al mismo tiempo una amenaza actual en la lucha por obtener alimentos sanos. Un ejemplo de esto lo es el hecho de que *Listeria* es un psicrótrofo, es decir, un microorganismo que es capaz de desarrollar a temperaturas de refrigeración, mientras que se inhibe el desarrollo de la flora bacteriana competitiva no psicrótrofa (Anónimo, 1987; Palumbo, 1986).

Afortunadamente y a pesar de su relativa resistencia a altas temperaturas, la pasteurización rápida de la leche, correctamente llevada a cabo, ha demostrado ser un método seguro para eliminar o disminuir la cantidad de listerias hasta niveles que no representan un riesgo a la salud (CDC, 1988; OMS, 1989).

La leche y los derivados lácteos como los quesos frescos, son alimentos de gran valor nutritivo y de amplio consumo popular. Estos productos soportan bien el desarrollo de *L. monocytogenes* y han destacado por su frecuente participación en los casos y brotes de la enfermedad reportados en otros países (NACMCF, 1991).

Aún cuando *Listeria* no sobrevive a la pasteurización, muchos de los problemas de contaminación del producto final con este patógeno han sido resultado de la contaminación de la leche, sobrevivencia por proceso inadecuado originando contaminación postproceso (Farber y Peterkin, 1991, Piccinin *et al.*, 1995) y al establecimiento del patógeno en el ambiente de la fábrica (Jeong y Frank, 1994).

En México, los quesos fueron los alimentos mas frecuentemente involucrados (31.4 %) en los 58 brotes (de etiología microbiana) confirmados de los 79 estudiados de un total de 314 brotes de Enfermedades de Transmisión Alimentaria con 12,344 casos y 348 defunciones, notificados a la Dirección General de Epidemiología de la

Secretaría de Salud entre 1980 y 1989 (Parrilla, 1993), ninguno de estos brotes se asoció con *Listeria.*

En México está reglamentado que los quesos frescos se elaboren con leche pasteurizada (SSA, 1994; SSA, 1999), pero es común que a nivel artesanal se fabriquen con leche cruda y a nivel industrial con leche pasteurizada, en ambos se parte de una leche muy contaminada (Fernández *et al.*, 1982) y su producción, almacenamiento, transporte y comercialización se realizan bajo pobres condiciones sanitarias. Todos estos factores favorecen la contaminación y desarrollo en estos productos no solo de *Listeria* sino también de otros patógenos.

En países industrializados donde los quesos se elaboran y manejan con mejores condiciones sanitarias, el patógeno ha sido aislado de muchos tipos de quesos, y 75% de ellos fueron elaborados con leche pasteurizada (Doyle, 1994). La frecuencia de *L. monocytogenes* en quesos blandos de distintos tipos, osciló entre 0.5 y 10% (excluyendo los resultados provenientes de una misma fábrica) (Farber y Peterkin, 1991). Mientras que un estudio realizado en el Distrito Federal, México, (Vizcaíno y Mustre, 1992), reportó en quesos de los mercados de Chalco, un 2% de positividad a *L. monocytogenes.* Y en estudios realizados en quesos frescos de los mercados de Guadalajara, México, se encontró un 27 y 23% de frecuencia a *L. monocytogenes* en queso Panela y Ranchero respectivamente (Luis Juan *et al.*, 1992a; Luis Juan *et al.*, 1992b).

Aún cuando la dosis infectante de *L. monocytogenes* se desconoce, estimaciones indican que en el brote de California por queso Jalisco, ésta estuvo en el orden de 100 a 10,000 células, de los 142 casos, 48 eran inmunocomprometidos, mientras que en casos esporádicos en personas sanas fue de 10^6 a 10^9 células (Farber y Peterkin, 1991).

Cuando el germen se ha cuantificado en el queso, se encuentran cantidades desde <100 hasta 2.9 x 10^7 células por gramo de queso elaborado, ya sea con leche cruda o pasteurizada (Beckers *et al.*, 1987;

Eilertz *et al.*, 1993; Pini y Gilbert, 1988; Tham y Danielsson-Tham, 1988; Yousef y Marth, 1988).

L. monocytogenes se comporta de manera diferente en los distintos tipos de quesos elaborados con leche inoculada con el patógeno. La inhibición, sobrevivencia (queso Cottage, Colby, Empacado en Frío) o desarrollo del microorganismo (queso Brick, Feta y Camembert) (Farber y Peterkin, 1991; Yousef y Marth, 1988) depende principalmente del tipo de cepa empleada y de las diferentes condiciones de elaboración, madurado y almacenamiento (composición, humedad, pH, temperatura, ácido láctico, flora asociada, etc.) (Guyer y Jemmi, 1991; Papageorgiou y Marth, 1989).

En otro estudio realizado en Guadalajara, México, el queso Panela resultó ser un buen sustrato para el desarrollo de *L. monocytogenes* cepa California, durante su fabricación y almacenamiento aún a temperaturas de refrigeración (Luis Juan *et al.*, 1995a).

Si bien, solo se han realizado estudios aislados en leche y en algunos quesos frescos, y dado que cada queso presenta características muy particulares que inciden en la frecuencia y comportamiento del microorganismo, es necesario que se realicen estudios específicos en cada tipo de queso, con el fin de poder implementar medidas de control y prevención de la enfermedad.

El queso Adobera es un queso fresco típico mexicano, en forma de adobe, de pasta chedarizada (acidificada) molida, no amasado en caliente ni hilado. Su pasta es blanda, acidificado por la microflora natural de la leche y prensado ligeramente. Este queso tiene gran aceptación a nivel nacional ya que no solo es apreciado en Jalisco (de donde probablemente es oriundo) sino en diversos estados del país (Villegas, 1993). El queso adobera esta clasificado (Secretaría de Salud, 1994) como queso fresco de pasta cocida, sin embargo, a nivel local, tradicionalmente se elabora sin cocción de la pasta y no recibe ningún

otro tratamiento térmico o madurado posterior. Debido al prolongado tiempo (20 h) para acidificar la pasta, el método tradicional para elaborar este queso puede ser objetable desde el punto de vista sanitario, ya que si la microflora acidificante (lactobacilos termodúricos) en la cuajada no es numerosa y activa, existe el riesgo potencial para el desarrollo de patógenos presentes (Villegas, 1993). Aunado a esto, en el extranjero (Doyle, 1994), quesos similares (de baja acidez como el estilo-Mexicano, Camembert y Brie) junto con el paté, se consideran alimentos de especial preocupación para los grupos de riesgo, por estar éstos últimos, asociados a numerosos casos de listeriosis y porque soportan el desarrollo de grandes poblaciones de *Listeria*.

De aquí que resulta interesante conocer la participación del queso Adobera como vehículo de *Listeria*, determinando su frecuencia, nivel de contaminación y comportamiento en el producto y de esta forma contribuir a determinar la ecología del patógeno y con ello facilitar la investigación epidemiológica de la listeriosis en el país, información indispensable para poder implementar medidas de control y prevención de esta enfermedad.

La inclusión de la determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos, dentro de las especificaciones sanitarias de la Norma Oficial Mexicana (NOM-121-SSA1-1994) (Secretaría de Salud, 1994), resalta la importancia que se comienza a dar a este patógeno en México.

2. MARCO TEORICO

2. MARCO TEORICO

Historia de la enfermedad.

La listeriosis no es una enfermedad nueva: A fines del siglo pasado ya se informó del hallazgo de bacilos grampositivos en tejidos de pacientes que probablemente tuvieron listeriosis (Eilertz *et al.*, 1993; Lovett, 1989b).

En 1919, Dumont y Cotoni aislaron un "difteroide" de líquido cefalorraquídeo de un soldado con meningitis y fue conservado por más de 20 años, antes de ser identificado como *L. monocytogenes* (Gellin y Broome, 1989; McLauchlin, 1987).

En 1926, Murray *et al.*, informaron el hallazgo de un bacilo grampositivo como agente causante de una epizootia en conejos y cobayos de laboratorio. A estos investigadores se les acredita el descubrimiento de *L. monocytogenes* a la cual denominaron *Bacterium monocytogenes* en virtud de que la infección se caracterizó por una monocitosis (Gellin y Broome, 1989; McLauchlin, 1987).

Pirie, al siguiente año, aisló del hígado de roedores sudafricanos un microorganismo similar al descrito por Murray y col., y lo llamo *Listerella hepatolytica*, en honor de Joseph Lister (Gellin y Broome, 1989; McLauchlin, 1987).

El primer informe de listeriosis humana lo hizo Nyfeldt en 1929, quien aisló el microorganismo de sangre de pacientes con síntomas de mononucleosis infecciosa. Este autor lo denominó *Bacterium monocytogenes hominis* (McLauchlin, 1987).

Burn en 1936 señaló que la bacteria podía causar infección en seres humanos durante el período perinatal y también meningitis en los adultos (McLauchlin, 1987).

En 1940, Pirie propuso que el microorganismo fuera nombrado *Listeria monocytogenes*, nombre que fue aceptado más tarde y que actualmente lleva el agente causal de la listeriosis (Lovett, 1989b).

A partir de los primeros aislamientos confirmados de *Listeria* en infecciones individuales hechos en 1929 por Gill a partir de ovejas y por Nyfeldt a partir de humanos, se han seguido reportando casos esporádicos de listeriosis, y con frecuencia en trabajadores que han estado en contacto con animales enfermos (Farber y Peterkin, 1991).

A consecuencia de los brotes de listeriosis transmitidos por alimentos, el interés de parte de los fabricantes de alimentos y de las autoridades por este microorganismo, creció rápidamente en los 1980s, con un simultáneo aumento de la literatura publicada (Farber y Peterkin, 1991).

Incidencia de la Listeriosis: Morbilidad y Mortalidad.

La listeriosis hasta antes de 1981 era relativamente rara y en todo el mundo solo se habían reportado cerca de 5,000 casos (Barriga *et al.*, 1981). El Centro para el Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta, Georgia, EUA, estimó que la tasa de incidencia anual de la enfermedad en EUA para 1980-1982 era de 3.6 por millón de habitantes (Gellin y Broome, 1989). El mismo centro calculó que la incidencia anual en ese país había aumentado 7.1 (1700 casos) y 7.4 casos por millón de habitantes para 1986 y 1988-1990 respectivamente (Gellin y Broome, 1989, Schuchat *et al.*, 1991), sin embargo, para 1993 la tasa disminuyó a 4.2 por millón de habitantes (Tappero *et al.*, 1995).

La incidencia anual de listeriosis en Europa para 1986 fue de 0.1 a 11.3 casos por millón de habitantes (Gellin y Broome, 1989). Mientras que en 16 países de Europa en los últimos años (1984-1989) la incidencia se encontraba entre 1.6 y 14.7 casos por millón de habitantes, siendo Francia el país con la tasa mas alta durante 1986 (Farber y Peterkin, 1991). Inglaterra y Gales por su parte reportaron que de 1986 a 1988, la incidencia del padecimiento se había incrementado a casi 150 % (Cox, 1989a).

En Barcelona, España un estudio realizado durante 1990 arrojó una incidencia de 10.95 por millón de habitantes, representando una de las más altas incidencias reportadas en la literatura (Nolla-Salas *et al.*, 1993).

Los aumentos en la incidencia de la enfermedad mostrados por estos países pudieron ser debidos a la implementación de la obligatoriedad de su informe, a la aplicación de sistemas de vigilancia epidemiológica del padecimiento o a ambas cosas.

Los datos sobre listeriosis en México son muy escasos: en 1981 sólo se conocían 16 casos de la enfermedad, 12 de meningoencefalitis y 4 de septicemia (Barriga, 1981). Antes de esa fecha, algunos estudios realizados en sangre (Guyer y Jemmi, 1991), en diversos tejidos de recién nacidos muertos (Roch y Varela, 1963; Victoria *et al.*, 1967), de exudados vaginales normales y patológicos (Doyle y Schoeni, 1987a), así como algunas encuestas serológicas realizadas en seres humanos y animales (Giono y Pérez, 1963; Varela *et al.*, 1959), pusieron en evidencia la presencia de *L. monocytogenes* en la población y su participación en la infección perinatal y no perinatal.

Los datos obtenidos del estudio realizado por Solórzano *et al.*, (1989), en 9,283 recién nacidos vivos atendidos en el Instituto Nacional de Perinatología durante 1987 y 1988, destacan la importancia que tiene *L. monocytogenes* como agente causal de la infección neonatal. Del total de recién nacidos vivos estudiados, a 241 se les diagnosticó septicemia neonatal y a siete de estos se les aisló *L. monocytogenes* .

Como ocurre con otras enfermedades transmitidas por alimentos, las tasas aquí presentadas muy probablemente están subestimadas, ya que entre otras causas, existen casos en los que por diversas razones no se realiza el cultivo de las muestras sospechosas (NACMCF, 1991). Cabe recalcar, como lo señalan algunos de los autores de los trabajos mencionados (Barriga *et al.*, 1981; Solórzano *et al.*, 1989), que siempre que se ha buscado de manera intencionada el microorganismo, ha sido posible aislarlo.

La listeriosis humana se caracteriza por una elevada tasa de letalidad y a nivel mundial, según datos de 1989, se ha calculado entre 13 y 34 % (Farber y Peterkin, 1991). En los grandes brotes la letalidad se ha reportado cercana al 30 % (Pearson y Marth, 1990), mientras que en los casos

esporádicos ha estado en el orden de 23 % (Farber y Peterkin, 1991). En 31 casos de listeriosis humana ocurridos en Barcelona, España durante 1990 la letalidad fue de 51.6 % (Nolla *et al.*, 1993). Por su parte la listeriosis neonatal a pesar de la moderna terapia antibiótica aun presenta una tasa de letalidad alrededor del 36 % (Farber y Peterkin, 1991). Aunado a esto y como ya se mencionó antes, se cree que en EUA la listeriosis puede ser la enfermedad más letal transmitida por alimentos (Farber y Peterkin, 1991). Gellin *et al.* (1991), mencionan que mientras otros patógenos transmitidos por alimentos pueden causar mayor morbilidad en EUA, alrededor del mundo, ninguna enfermedad transmitida por alimentos, incluyendo el botulismo, tiene una tasa de letalidad tan alta.

Impacto económico de la Listeriosis.

La listeriosis a pesar de estar subestimada se asocia con un importante costo económico. En EUA los casos conocidos de listeriosis, además de los costos por morbilidad y mortalidad, han tenido por gastos médicos y por perdida de la productividad, un costo estimado en más de $ 250 millones de dólares anuales (NACMCF, 1991). Sólo por citar algunos, los siguientes casos ocurridos también en EUA demuestran los efectos económicos de este microorganismo. Entre 1985 y 1986 fueron ordenadas varias devoluciones de quesos blandos caseros franceses que resultaron contaminados con *Listeria*. Una planta de lácteos se clausuró en Texas y otra de helados en California, después de haberse identificado *Listeria* en sus productos o en el medio ambiente. Una enorme compañía lechera tuvo una devolución de una novedad de helado, además del cierre y saneamiento de sus plantas productoras, representando un costo total de más de $ 12 millones de dólares y la pérdida del producto en línea. Una lechera regional tuvo pérdidas por $ 3 millones de dólares debido al decomiso de una extensa línea de helado después de que *Listeria* se encontró en el producto terminado y en la planta (Medallion, 1987).

Actualmente, en otros países, aún se siguen destruyendo grandes cantidades de alimentos "comestibles", debido a la política de "tolerancia cero" a *Listeria*, por lo que es urgente que se conozca la dosis infectante y los factores ambientales que regulan la expresión de los determinantes de virulencia en los diferentes nichos ecológicos donde se aisla *Listeria*. Y una vez que se haya definido más claramente la virulencia del patógeno, las devoluciones se podrán limitar a alimentos con una contaminación elevada y por cepas altamente virulentas (Schlech III, 1992). En la mayoría de los países europeos intentan ahora prevenir la distribución y venta de queso (y algunas veces otros alimentos "listos para comer") que contengan >100 ufc/g de *Listeria monocytogenes* (Ryser, 1999c).

Clasificación.

El género *Listeria* continúa sin una posición taxonómica bien establecida con respecto a otros géneros (Seeliger y Jones, 1986). En la novena edición del Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (1994), el género es colocado, junto con *Lactobacillus, Erysipelothrix, Brochothrix* y otros géneros, en una sección titulada "Bacilos regulares gram positivos no esporulados", sin designarle una familia o tribu de afiliación.

Las especies que conforman el género han venido cambiando con el tiempo. *L. monocytogenes* fue la única especie de *Listeria* reconocida hasta 1961 (Farber y Peterkin, 1991). En la octava edición del Manual Bergey (1974), sólo se describieron 4 especies de *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi*. La primera estaba constituida por un grupo heterogéneo que incluía cepas patógenas y no patógenas (Lovett, 1989b, Seeliger y Jones, 1986). Seeliger (1981) propuso y logró que las cepas no patógenas de *L. monocytogenes*, las cuales pertenecían al serotipo w6, se reconocieran como una nueva especie, *L. innocua* (Seeliger y Jones, 1986). Mas tarde, estudios de hibridización de ADN-ADN realizados en una gran colección de cepas de *Listeria* aisladas de diversas fuentes, indicaron la existencia de 5 grupos homólogos de ADN-ADN entre las cepas (Seeliger y

Jones, 1986). Uno de los 5 grupos genómicos contenía la cepa tipo de *L. monocytogenes*, un segundo grupo contenía aquellas cepas denominadas como *L. innocua* y un tercero agrupaba las cepas que exhibían una beta hemólisis pronunciada y a las cuales se les llamó *L. ivanovii*. Los otros dos grupos genómicos fueron designados como *L. seeligeri* y *L. welshimeri* (Seeliger y Jones, 1986). En la edición de 1986 del Manual Bergey, se aceptan 5 especies de *Listeria*: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii* y 3 especies catalogadas como inciertas o controversiales: *L. denitrificans*, *L. grayi* y *L. murrayi*. Estudios de taxonomía numérica y química, hibridación de DNA, secuenciación de RNAr 165-235, entre otros, han confirmado que *L. denitrificans* no pertenece al género *Listeria* y es colocada en un nuevo genero *Jonesia,* como *J. denitrificans* (Rocourt *et al.*, 1987), mientras que *L. grayi* y *L. murrayi* son consideradas como miembros de una misma especie, *L. grayi* (Rocourt *et al.*, 1992), de ahí que actualmente el género *Listeria* está formado por seis especies: *L. monocytogenes, L. ivanovii, L. innocua, L. seeligeri, L. welshimeri* y *L. grayi* (Rocourt, J., 1999).

Características del género *Listeria*

Características microscópicas.

Los microorganismos del género *Listeria* son bacilos cortos, de 0.4 a 0.5 micras de diámetro y de 0.5 a 2 micras de longitud, con extremos redondeados (Figura 1). En frotis teñidos pueden observarse en células individuales, cadenas cortas, formando empalizadas, o con arreglos en forma de V o Y. Esta última característica hace que con frecuencia *L. monocytogenes* sea confundida con difteroides y los cultivos sean descartados como contaminantes. Las células procedentes de cultivos viejos o colonias rugosas pueden presentar formas filamentosas de 6 a 20 micras de longitud (Seeliger y Jones, 1986).

Figura 1. Microfotografía electrónica de *Listeria monocytogenes* sobre un corte de acero inoxidable después del tratamiento con 200 ppm, de solución de hipoclorito de sodio (Ryser y Marth, 1991).

Son bacterias grampositivas, aunque células de cultivos viejos, de 3 a 5 días, puede ser gramvariable (Lovett, 1989b). No forman esporas o cápsula y no son alcohol ácido resistentes (Seeliger y Jones, 1986).

Son móviles cuando provienen de cultivos incubados entre 20 y 25 °C, su movimiento es en forma de tumbos y esta dado por 1 a 5 flagelos perítricos.

Características de cultivo.

Todas las especies de *Listeria* desarrollan bien en medios de cultivo nutricionalmente simples y a pH entre 6 y 9 (Seeliger y Jones, 1986). Son aerobias y facultativamente anaerobias; y su temperatura óptima de desarrollo está entre 30 y 35 °C aunque pueden crecer en un intervalo tan amplio como 1 y 45 °C (Jones, 1990).

Las colonias de un cultivo de 24 a 48 h en agar nutritivo son redondas, de 0.5 a 1.5 mm de diámetro, de borde entero, translúcidas con apariencia de gotas de rocío, convexas y lisas (Seeliger y Jones, 1986). Cuando se observan empleando la iluminación oblicua descrita por Henry, las colonias tienen un brillo azulgris o azulverde y una apariencia de vidrio despulido (Lovett, 1989b; Seeliger y Jones, 1986).

En medios que contienen carbohidratos aprovechables, las colonias pueden llegar a medir hasta 3.0 mm de diámetro (Lovett, 1989b). En agar sangre, las colonias son translúcidas y conforme pasa el tiempo presentan una coloración blanco-grisáceo. Solo 3 especies, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii*, son beta hemolíticas. *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* producen una zona de hemólisis estrecha y discreta, mientras que la hemólisis producida por *L. ivanovii* es amplia y claramente delineada (Seeliger y Jones, 1986). La reacción hemolítica puede observarse más fácilmente cuando el medio es sembrado por picadura.

Hoy en día, en el comercio están disponibles diversos medios selectivos especialmente diseñados para aislar *L. monocytogenes* de los alimentos y ambientes muy contaminados.

Características bioquímicas.

Los miembros del género *Listeria* pueden ser confundidos con aquellos pertenecientes a los géneros *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Lactobacillus* y *Kurtia* (Seeliger y Jones, 1986). Este último puede diferenciarse de *Listeria* por su incapacidad para producir ácido a partir de glucosa y su carácter de aerobio estricto. La mayor parte de los lactobacilos son inmóviles y no producen catalasa, mientras que, todas las especies de *Listeria* son móviles y catalasa positivas. Estas dos últimas pruebas son útiles también para distinguirla de *Erysipelothrix*, aunada a la producción de H_2S en TSI; *Listeria* da la prueba negativa. *Brochothrix thermosphacta*, un psicrótrofo similar a *Listeria*, puede ser diferenciado de esta, por su incapacidad para desarrollar a 35 °C y su inmovilidad (Seeliger y Jones, 1986).

Todas las especies de *Listeria* son catalasa positivas y son además oxidasa negativas. Fermentan la glucosa y la maltosa sin producción de gas. Son rojo de metilo y Voges Proskauer positivas. Hidrolizan la esculina y el ácido hipúrico pero no la urea (Seeliger y Jones, 1986). La diferenciación entre las especies de *Listeria* puede lograrse con las pruebas que aparecen en el cuadro 1.

La prueba de CAMP es útil para diferenciar las especies hemolíticas de *Listeria* y ayuda a distinguir a *L. monocytogenes* de *L. innocua*, que son bioquímicamente similares (Schuchat *et al.*, 1991, Seeliger y Jones, 1986) La prueba se realiza en agar sangre de ovino y se emplea una cepa de *S. aureus* beta hemolítico y una de *Rhodococcus equi*. La reacción de CAMP que producen estas especies puede verse en el cuadro 1.

Características antigénicas.

El esquema antigénico de *Listeria* aceptado actualmente está basado en el descrito por Paterson en 1940, quien reconoció 4 serovariedades o serotipos que designó como: 1, 2, 3 y 4 (Seeliger y Jones, 1986). El esquema se hizo tomando en consideración, en principio, los antígenos flagelares (H) y en segundo término los antígenos somáticos (O). Durante la década de los 70s., el esquema de Paterson fue refinado y ampliado por Donker-Voet en 1972 y Seeliger en 1975 y 1976. Estos investigadores propusieron el sistema de serotipificación para el género *Listeria* que actualmente está vigente y que comprende 16 serotipos y excluye a las especies *L. grayi* y *L. murrayi*, ya que estas son serológicamente diferentes a las otras especies de *Listeria* (Seeliger y Jones, 1986). Por otra parte, *L. monocytogenes* esta conformada por 13 serotipos (ver cuadro 2), de los cuales 1/2a, 1/2b y 4b se aislan con frecuencia de seres humanos enfermos (Jones, 1990; Schuchat *et al.*, 1991). La existencia de cepas de *L. seeligeri* que exhiben la misma composición antigénica de los serotipos 1/2b, 4c, y 4d de *L. monocytogenes* (Seeliger y Jones, 1986) y la reacción cruzada de algunos serotipos de *Listeria* con cepas de enterococos, de *Escherichia coli*, de *Staphylococcus aureus* y con algunas

Cuadro 1. Pruebas empleadas en la diferenciación de las especies de *Listeria*

ESPECIE	HEMOLISIS BETA*	REDUCCION DE NITRATOS	UTILIZACION DE			PRUEBA DE CAMP		PATOGENICIDAD
			RAMNOSA	XILOSA	MANITOL	*S. aureus*	*R. equi*	(PRUEBA EN RATON)
L. monocytogenes	+	-	+	-	-	+	-	+
L. ivanovii	+ +	-	-	+	-	-	+	+
L innocua	-	-	V [a]	-	-	-	-	-
L. welshimeri	-	-	V	+	-	-	-	-
L. seeligeri	= + [w]	-	-	+	-	+	-	-
L. grayi	-	-	-	-	+	-	-	-
L. murrayi	-	+	V	-	+	-	-	-

*; + = Moderada ; ++ = Fuerte ; w = débil

Fuente: Keer et al., 1998 y FDA, 1998

Cuadro 2. Serotipos de *Listeria*

ESPECIE	SEROTIPO
L. monocytogenes	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e y 7
L. ivanovii	5
L innocua	4ab, 6a, 6b, Nd*
L. weishimeri	6a, 6b,
L. seeligeri	1/2b, 4c, 4d, 6b, Nd*

*Nd = No designado

Fuente: Seeliger y Jones, 1986

corynebacterias móviles (Lovett, 1989b; Seeliger y Jones, 1986), demandan que la serotipificación sea interpretada cautelosamente y siempre en conjunto con las pruebas bioquímicas.

La evaluación de los aislamientos a partir de los primeros brotes de listeriosis, ha demostrado que la serotipicación no es lo suficientemente útil en la definición de las cepas relacionadas con los brotes. Junto con los serotipos, la fagotipia permite un análisis por grupos más discreto, pero muchas cepas son intipificables, la técnica es poco estandarizada y no está ampliamente disponible. Las cepas de *Listeria* usualmente no contienen plásmidos de ADN y el análisis de fragmentos de restricción del ADN cromosómico puede ser demasiado discriminatorio. Por otra parte, la electroforésis enzimática ha cambiado el panorama de la subtipificación de *Listeria*, desde su introducción en 1980. Dentro de los serotipos de *L. monocytogenes* se ha definido un gran número de electroferotipos, esto permitió el uso de estimadores de probabilidad en el estudio de Pinner y col., para basar la asociación de cepas de *L. monocytogenes* aisladas de los pacientes, y de los alimentos del mismo tipo en paquetes cerrados durante su venta al menudeo (Schlech III, 1992).

Resistencia a factores físicos y químicos.

L. monocytogenes es uno de los pocos microorganismos patógenos, transmitidos por alimentos que pueden desarrollar a temperaturas de refrigeración y en muy diversos alimentos, en especial los que tienen pH arriba de 6.0 (Cox, 1989a), pudiendo hacerlo a temperaturas de 1 °C (Seeliger y Jones, 1986). Las células vegetativas de este microorganismo son de las más termoresistentes (Lovett, 1989b), sin embargo en general temperaturas mayores de 50 °C son letales para el patógeno (Lou y Yousef, 1999). Aunque existen reportes que aluden la posibilidad de que *L. monocytogenes* pueda sobrevivir al tratamiento térmico mínimo para pasteurizar la leche (71.1 °C/15 seg), diversos trabajos realizados, entre otros por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) y la propia

Organización Mundial de la Salud (OMS) sostuvieron que este procedimiento realizado correctamente garantiza la destrucción del patógeno (Lou y Yousef, 1999). Aunque inicialmente fue consignado que *L. monocytogenes* desarrollaba a pH entre 5.0 y 9.6 (Lovett, 1989b), posteriores ensayos demostraron que el patógeno puede desarrollar a valores de pH menores de 5, cuando se le proporciona una temperatura cercana a la óptima de desarrollo y se le permite un tiempo suficiente para superar la fase lag que bajo estas condiciones de pH, se prolonga (Lou y Yousef, 1999). Al parecer la inhibición a pH bajo, depende de la naturaleza del ácido, siendo los ácidos orgánicos (acético > láctico > cítrico) más inhibitorios que el ácido clorhídrico (Fernández *et al.*, 1982). Algunos informes señalan también la capacidad del microorganismo para tolerar altas concentraciones de NaCl. En 1961, Seeliger indicó que la bacteria podía desarrollar en NaCl al 10% y sobrevivir por un año en NaCl al 16% cuando el pH es de 6.0 (Lovett, 1989b). En 1988, Doyle señala que ésta es capaz de sobrevivir a concentraciones del 30% de NaCl y a las de nitritos permitidos en alimentos. Sobrevive largos períodos de desecación, así como a congelaciones y descongelaciones repetidas (Jones, 1990). Estudios de sobrevivencia en materia fecal de animal artificialmente contaminada, revelaron que *L. monocytogenes* podía permanecer viable de 1 a 18 meses, según el contenido de humedad de las heces (Doyle y Schoeni, 1987a). Hasta hace unos años, *L. monocytogenes* fue considerada como susceptible a los antibióticos comúnmente empleados contra bacterias grampositivas, sin embargo, a finales de los ochentas y principios de los noventas, se obtuvieron varios aislamientos multirresistentes de personas enfermas (MacGowan *et al.*, 1990; Poyart-Salmeron *et al.*, 1990; Quentin *et al.*, 1990; Slade y Collins, 1990) y de alimentos (Facinelli *et al.*, 1991, Wong *et al.*, 1990).

Características de la enfermedad.

Patogénesis y virulencia.

De las seis especies de *Listeria* reconocidas hasta hoy, *L. monocytogenes* es considerada el principal patógeno para el hombre y para un gran número de especies animales (Gellin y Broome, 1989). Aunque *L. ivanovii* es débilmente patógena para ovejas (NACMCF, 1991).

El 90% de todos los casos de listeriosis humana son provocados por solo 3 serotipos de *L. monocytogenes*: 1/2a, 1/2b y 4b (NACMCF, 1991).

La dosis mínima infecciosa de *L. monocytogenes* para individuos sanos o susceptibles, no se conoce, y es de esperarse, que ésta oscile primordialmente en función de la virulencia de la cepa y de la susceptibilidad del huésped (NACMCF, 1991).

A pesar de que no se conoce la principal vía de entrada del patógeno al organismo, la oral se perfila como una vía importante (Farber y Peterkin, 1991; Gellin y Broome, 1989; Jones, 1990). Se sabe que las embarazadas, los recién nacidos, los ancianos y los inmunocomprometidos son los más susceptibles a la listeriosis, no obstante, se han presentado casos en personas aparentemente sanas (Farber y Peterkin, 1991; Jones, 1990; Marth, 1988; Schlech *et al.*, 1983). Hasta la fecha, los mecanismos de patogenicidad de *L. monocytogenes* no han sido esclarecidos totalmente (Jones, 1990; Schlech *et al.*, 1983; Schlech, 1989). Varios compuestos químicos considerados como factores de virulencia de *L. monocytogenes*: una hemolisina denominada también listeriolisina O; dos enzimas, la catalasa y la superoxidodismutasa y; algunos compuestos de superficie referidos como la proteína p60, proteína Act A, proteínas internalinas (A, B, C) y dos fosfolipasas C (PC-PLC, PI-PLC) (Rocourt y Cossart, 1997). Todo parece indicar que la proteína p60 junto con la internalina A, promueven la adhesión y la penetración de *L. monocytogenes* a las células fagocíticas, mediante la inducción de su propia fagocitosis. Una vez dentro, la listeriolisina O lisa las vacuolas fagocíticas permitiendo la sobrevivencia y multiplicación del microorganismo. En esta etapa, también se ha involucrado a una de las fosfolipasas C, la PI-PLC. A continuación las nuevas células de *Listeria* son

recubiertas con filamentos de actina A, procedentes de la célula huésped que les permite trasladarse hacia la membrana celular donde se forma una especie de pseudópodo que facilita al patógeno introducirse a una célula adyacente y así diseminarse en el organismo (Rocourt y Cossart, 1997).

Patología.

Patológicamente, la listeriosis del recién nacido involucra a muchos órganos, incluyendo el pulmón, hígado, bazo y ganglios linfáticos (Lichtenberg, 1987). Las lesiones, comúnmente son microabscesos que alteran con nódulos grisáceos o amarillos que representan restos tisulares necróticos amorfos basófilos (Lichtenberg, 1987). En las etapas iniciales de la enfermedad, hay una inflamación aguda con numerosos neutrófilos en y alrededor de los abscesos (Ritchie, 1990). Mas tarde, aparecen grandes cantidades de macrófagos alrededor de los abscesos necrosados y los neutrófilos desaparecen (Ritchie, 1990). En los recién nacidos vivos con sepsis, existe con frecuencia un exantema papuloeritematoso en las extremidades y en la placenta pueden verse abscesos. Un frotis del meconio revela la presencia abundante del agente causal (Lichtenberg, 1987).

La listeriosis en el adulto presenta lesiones generalmente confinadas a un solo órgano (Ritchie, 1990) y son similares a las que se presentan en el recién nacido. En los cuadros de meningitis, neumonía, conjuntivitis, otitis media y sinusitis nasal, los órganos afectados muestran inflamación aguda con un exudado en el que predominan los neutrófilos (Ritchie, 1990).

Manifestaciones clínicas.

a) Listeriosis durante el embarazo.

La infección en embarazadas comúnmente ocurre en el tercer trimestre de la gestación, aunque se han encontrado casos durante el primero y segundo trimestre (Farber y Peterkin, 1991; Gellin y Broome, 1989). La infección de la mujer embarazada generalmente principia con un cuadro similar al de la influenza, con fiebre, cefalalgia, mialgia y solo ocasionalmente, síntomas gastrointestinales (Gellin y Broome, 1989; Marth, 1988; Schuchat *et*

al., 1991). Este cuadro se presenta en aproximadamente dos terceras partes de los casos y corresponde a la fase bacteriémica de la infección. Este es el momento indicado para que a través de un hemocultivo, se pueda tener un diagnostico temprano de la enfermedad (Gellin y Broome, 1989; Schuchat *et al.*, 1991). La infección en la mujer embarazada es autolimitante y solo raramente se presenta meningitis (Gellin y Broome, 1989). Es mas probable que la infección del feto resulte de una transmisión transplacentaria, consecuente a la bacteriemia de la madre (Marth, 1988; Schuchat *et al.*, 1991) y conduzca al aborto, a un parto prematuro o a un parto con el producto muerto (Bille y Doyle, 1991; Jones, 1990; Schuchat *et al.*, 1991).

b) Listeriosis neonatal.

La listeriosis neonatal se ha clasificado, de acuerdo al tiempo de la presentación clínica, en dos síndromes. 1) "Inicio temprano": Este síndrome se manifiesta en los primeros 5 días de vida, como resultado de una infección intrauterina y se presenta con septicemia, neumonía y una amplia disminución de granulomas en placenta, hígado y otros órganos (Farber y Peterkin, 1991; Gellin y Broome, 1989; Jones, 1990; Schuchat *et al.*, 1991); la tasa de letalidad calculada es del 15-50% (Farber y Peterkin, 1991). 2) "Inicio tardío": Ocurre después del quinto día de vida, por una infección adquirida del aparato genital de la madre durante el parto o de fuentes ambientales después del nacimiento y con meningitis como cuadro predominante (Farber y Peterkin, 1991; Gellin y Broome, 1989; Schuchat *et al.*, 1991); la tasa de letalidad calculada es del 10-20% (Farber y Peterkin, 1991).

c) Listeriosis no perinatal.

La listeriosis que afecta a adultos (hombres y mujeres no embarazadas) y a niños, está principalmente asociada a condiciones predisponentes que incluyen: enfermedades neoplásicas, inmunosupresión, edad avanzada, diabetes, alcoholismo, enfermedades cardiovasculares y renales, disminución

de la acidez gástrica, SIDA y otras (Farber y Peterkin, 1991; Gellin y Broome, 1989; Gellin y Broome, 1991).

Los síndromes clínicos asociados con la listeriosis en adultos comprenden infecciones del sistema nervioso central (meningitis, meningoencefalitis, abscesos), bacteriemia o septicemia y endocarditis (Farber y Peterkin, 1991; Gellin y Broome, 1989; Schuchat *et al.*, 1991). La meningitis es la manifestación clínica más frecuente de las infecciones del sistema nervioso central y es comúnmente vista en ancianos y pacientes inmunocomprometidos (Farber y Peterkin, 1991; Gellin y Broome, 1989). Se conocen, sin embargo, casos de listeriosis en individuos aparentemente sanos, que adquirieron la enfermedad por el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* (Farber y Peterkin, 1991, Schlech *et al.*, 1983).

d) Infecciones focales (localizadas).

Ocurren solo ocasionalmente y se han visto sobre todo en pacientes inmunocomprometidos; comúnmente aparecen después de una etapa bacterémica (Bille y Doyle, 1991; Gellin y Broome, 1989; Jones, 1990). Este tipo de infecciones incluye a la endoftalmitis, artritis séptica, osteomielitis, peritonitis, colecistitis, absceso en hígado e infección pleuropulmonar (Gellin y Broome, 1989). Han ocurrido infecciones cutáneas en granjeros, veterinarios y trabajadores del rastro que atendieron o manejaron animales infectados (Gellin y Broome, 1989; Jones, 1990). También se han reportado casos de conjuntivitis en granjeros avícolas y en laboratoristas accidentalmente expuestos al patógenos (Gellin y Broome, 1989; Jones, 1990).

En el cuadro 3 se enlistan los principales tipos de listeriosis humana.

Epidemiología.

Fuentes y mecanismos de transmisión.

L. monocytogenes esta ampliamente diseminada en el medio ambiente y se ha recuperado de polvo, varios tipos de suelos, aguas, vegetales,

ensilados y de diversos alimentos crudos y procesados (Beckers *et al.*, 1987; Fernández *et al.*, 1987; Hayes *et al.*, 1986; Keer *et al.*, 1988; Pini y Gilbert,

Cuadro 3. Tipos de Listeriosis humana

• De la mujer embarazada
• Del recién nacido (Granulomatosis infantiséptica)
• Meningítica y meningoencefalítica
• Cutánea
• Septicemia con faringitis y mononucleosis
• Oculoglandular
• Neumónica y granulomatosis séptica
• Cervicoglandular
• Otros : Artritis Osteomielitis Abscesos espinales o cerebrales Peritonitis Colecistitis

Fuente: Marth, 1988

1988; Seeliger y Jones 1986; Skovgaard y Morgen, 1988; Weagant *et al.*, 1988; Wher, 1987; Wong *et al.*, 1990). La bacteria se ha aislado también de heces de una amplia gama de animales silvestres y domésticos y frecuentemente de individuos aparentemente sanos (Jones, 1990; Seeliger y Jones 1986; Skovgaard y Morgen, 1988).

La listeriosis se acepta generalmente como una zoonosis; una enfermedad o infección transmitida naturalmente entre animales vertebrados y humanos (Pearson y Marth, 1990). *L. monocytogenes* se ha aislado de por lo menos 42 especies de mamíferos y 22 especies de pájaros así como de pescado, crustáceos e insectos. Este patógeno puede causar "enfermedad de los círculos", encefalitis, meningitis, septicemia, aborto y mastitis (Pearson y Marth, 1990; NACMCF, 1991), y afecta a una amplia variedad de animales tanto domésticos como salvajes, infectando principalmente a ovinos y bovinos (NACMCF, 1991). Existe una variación estacional en la listeriosis animal ya que los casos se observan con mayor frecuencia a fines de invierno y a principios de primavera (NACMCF, 1991).

La manera mediante la cuál el ganado puede infectarse con *Listeria* es al ser alimentado con ensilados de mala calidad, particularmente los que tienen pH mayor de 5.1 (Anónimo, 1987), que albergan en ocasiones hasta más de 12,000 células por gramo (Barriga *et al.*, 1981). La eliminación del patógeno por la ubre o la contaminación del medio ambiente, puede ocasionar la presencia de *L. monocytogenes* en la leche cruda (Pearson y Marth, 1990).

L. monocytogenes puede infectar humanos y animales por las vías oral, ocular, cutánea, respiratoria o urogenital (NACMCF, 1991). Y se conocen múltiples rutas posibles a través de las cuales el germen puede llegar al hombre (Marth, 1988) (Figura 2), sin embargo poco se sabe de las fuentes y mecanismos de transmisión que operaron en muchos de los casos de listeriosis humana (Gellin y Broome, 1989; Jones, 1990). Tal desconocimiento se ha debido en buena parte a que la listeriosis era considerada como una

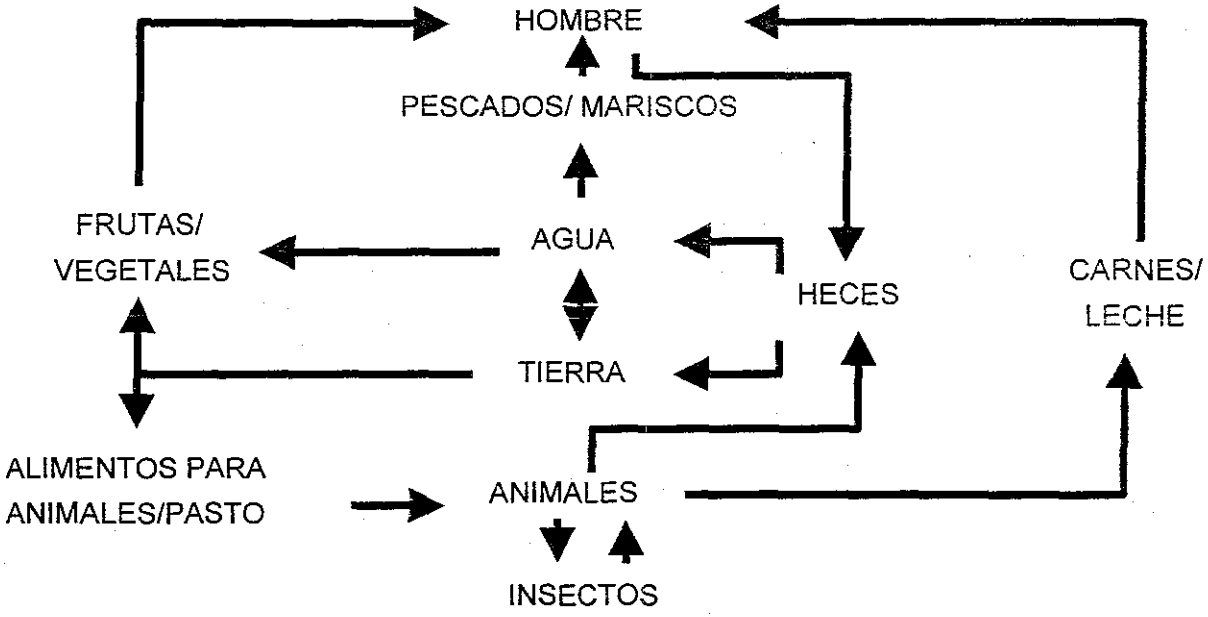


Figura 2. Ciclo hipotético de infección por *Listeria monocytogenes*

Fuente: Brackett, 1988

enfermedad rara y su notificación en países como los Estados Unidos de América, no tenían carácter de obligatorio sino hasta hace pocos años (Gellin y Broome, 1989). La misma ubicuidad del germen en el medio ambiente y la carencia de métodos discriminatorios confiables para su tipificación han sido también factores contribuyentes en ello (Jones, 1990).

Existen fuertes sugerencias de que una gran parte, de los animales de sangre caliente y el hombre, juegan un papel primario en la perpetuación y transmisión de la enfermedad. Muchos investigadores están de acuerdo en que ya sea el animal directamente o el contacto con el, juegan un papel mínimo en el modo de transmisión bajo condiciones naturales y que la enfermedad es transmitida por el contacto con descargas corporales que contaminan el medio ambiente. Y como se mencionó antes, el silo es quizás el vehículo primario de transmisión de *L. monocytogenes* a los animales (NACMCF, 1991).

En la actualidad se conoce que la transmisión de la mayoría de los brotes de listeriosis humana recientes, estuvieron relacionados con la ingestión de alimentos de origen animal contaminados con *L. monocytogenes*, a partir de fuentes ambientales (NACMCF, 1991).

Brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos.

Durante la década de los ochentas, varios brotes y casos esporádicos de listeriosis humana ocurridos en América del Norte y Europa y que fueron asociados epidemiológicamente al consumo de alimentos, dejó en claro la importancia de éstos como transmisores de la enfermedad. Algunos de estos brotes ocurrieron en EUA, Canadá, Nueva Zelanda, Suiza e Inglaterra (Cuadro 4), y se describen a continuación.

Entre Marzo y Septiembre de 1981 en las Provincias Marítimas de Canadá, ocurrió un brote de listeriosis con 41 casos (34 perinatales y 7 en adultos). Los casos perinatales incluyeron 5 abortos y 4 nacimientos muertos. La tasa de letalidad entre los niños que nacieron vivos fue del 27 %.

Cuadro 4. Brotes de listeriosis transmitidos por alimentos

LUGAR (AÑO)	No. DE CASOS (No. de muertes)	ALIMENTOS ASOCIADOS	REFERENCIAS
Boston, EUA (1979)	20 (5)[a]	Apio, tomates, lechuga[b]	Ho *et al.*, 1986
Nueva Zelanda (1980)	29 (9)	Mariscos y pescado crudo[b]	Lennon *et al.*, 1984
Canadá (1981)	41 (17)	Ensalada de col	Schlech *et al.*, 1983
Massachusetts, EUA (1983)	49 (14)	Leche Pasteurizada[b]	Fleming *et al.*, 1985
California, EUA (1985)	142 (48)	Queso estilo Mexicano	Linnan *et al.*, 1988
Vaud, Suiza (1983-87)	122 (31)	Queso Mont d'Or	Bille, 1990
Filadelfia, EUA (1986-87)	38 (18)	Helado[b], salami[b]	Schwartz, 1989
Connecticut, EUA (1989)	9 (1)	Camarón[b]	Riedo, 1990
Reino Unido (1987-89)	>300 (7)	Paté[b]	McLauchlin *et al.*, 1991
Dinamarca (1989-1990)	26 (6)	Queso azul Danés	Jensen *et al.*,1994
Francia (1995)	33(?)	Queso brie de Meaux	Jacket, *et al.*, 1995
Francia (1997)	14(?)	Queso Pont l'Evêque	Goulet, 1998
Carolina del Norte, EUA (2001)	12 ( )	Queso estilo Mexicano	Boggs *et al.*, 2001

[a] = La causa aparente de 2 de estas 5 muertes, fue una enfermedad debilitante y no listeriosis .

[b] = Alimentos solo involucrados epidemiológicamente

FUENTE: Farber y Peterkin, 1991; Ryser 1999a; Boggs *et al.*, 2001

El análisis del estudio de los casos y controles reveló la asociación del consumo de ensalada de col con la infección. Además, se aisló la cepa epidémica de *L. monocytogenes* tipo 4b de la ensalada de col obtenida del refrigerador de uno de los pacientes. Posteriormente se descubrió que en la granja que abastecía de col a la fábrica donde se producía la ensalada, se usó estiércol de oveja como abono, sin ningún tratamiento. Durante los dos años anteriores al brote, varias ovejas de la granja de donde procedía el estiércol, habían tenido listeriosis y dos de ellas habían muerto de la enfermedad (Schlech *et al.*, 1983).

Otro brote de listeriosis que involucró también a vegetales crudos, se presentó entre septiembre y octubre de 1979 en Boston, Massachusetts, afectando 23 pacientes hospitalizados, los cuales presentaron una infección sistémica por *L. monocytogenes*, mientras que en los 26 meses anteriores solo habían sido detectados 9 casos. En 20 de los pacientes se aisló el serotipo 4b de *L. monocytogenes*. 15 de los 20 pacientes adquirieron la infección en el hospital y 12 de los 20 recibieron antiácidos y cimetidina, antes del inicio de la enfermedad. Los pacientes habían comido con mas frecuencia que los controles: atún, ensalada de pollo y queso, sin embargo cabe señalar que los alimentos se sirvieron acompañados de apio, tomate y lechuga cruda. Los vegetales crudos pudieron haber estado contaminados con *Listeria*, la cual fue capaz de sobrevivir a la ingestión debido a la neutralización del ácido gástrico por la administración de los antiácidos (Ho *et al.*, 1986).

Un segundo brote en Massachussets, EUA, ocurrió en el verano de 1983 y estuvo asociado con *L. monocytogenes* tipo 4b. Afectó a 42 adultos inmunocomprometidos, 5 recién nacidos y 2 fetos, resultando una letalidad del 29%. El estudio epidemiológico reveló que el brote estuvo fuertemente asociado a la ingestión de una marca específica de leche pasteurizada. No se logró aislar a *Listeria* de la leche pasteurizada, pero sí de la leche cruda procedente de establos que abastecían a la planta pasteurizadora

involucrada, aunque no del mismo fagotipo epidémico. Inspecciones en la planta no revelaron evidencia de incorrecta pasteurización y no se identificaron fuentes de contaminación postpasteurización. Este reporte fue uno de los puntos de partida para indicar un posible incremento de la resistencia térmica de *L. monocytogenes*, sugiriendo además, que la localización intracelular le confería una protección adicional (Fleming *et al.*, 1985; NACMCF, 1991).

La epidemia más grande de listeriosis en Norteamérica ocurrió en California en los condados de Orange y Los Angeles, en 1985. De los 142 casos ocurridos en un período de 8 meses, 93 fueron perinatales y 49 en adultos, con una tasa de letalidad de 34%, incluyéndose entre las muertes a 30 fetos y recién nacidos y 18 adultos (ninguna mujer embarazada). De los 93 casos perinatales el 95% ocurrió en mujeres hispanas embarazadas. De los 49 adultos infectados 48 fueron personas inmunocomprometidas, ancianos o personas que tenían algún tipo de enfermedad severa crónica. El estudio de casos y controles implicó al queso fresco tipo mexicano de una marca específica. Se confirmó la presencia en el queso de *L. monocytogenes* tipo 4b del mismo fagotipo y serotipo recuperado de los casos clínicos. Asimismo, se aisló *L. monocytogenes* del mismo fagotipo epidémico, a partir de las muestras ambientales, tomadas de la planta involucrada. Aunque se encontró que el pasteurizador estaba en buenas condiciones de operación, el 11% de las muestras de queso fueron positivas a la prueba de fosfatasa y existía el registro de que en varias ocasiones la compañía procesó más leche cruda de la que el pasteurizador podía manejar, así como la posible contaminación del queso con leche cruda. La fábrica fue cerrada y se retiraron del mercado los quesos de la marca implicada. Este fue el primer brote registrado de listeriosis en el que el alimento causante, se identificó y se retiró del mercado durante el brote (James *et al.*,1985; NACMCF, 1991).

Otro brote debido al consumo de queso blando, se presentó en el oeste de Suiza (Canton de Vaud). Durante el período de 1983 a 1987, se registraron

122 casos de listeriosis con 31 muertes. Mas del 85% de las cepas aisladas durante el período epidémico, fueron de un fagotipo y serotipo (4b) similar. Al principio no se encontró la fuente ni la vía de transmisión. Sin embargo, siguiendo el brote causado por el queso "Jalisco", se realizó en Suiza un extenso estudio buscando *L. monocytogenes* en los productos lácteos. Cuando se serotipificaron las cepas de *Listeria* aisladas de los lácteos, únicamente las cepas recuperadas del queso blando Vacherin Mont d'Or, fueron idénticas a las cepas causantes del brote. En la investigación subsecuente de la producción total de queso Vacherin, también se obtuvieron cepas del mismo serotipo y fagotipo. Los casos clínicos se observaron principalmente durante el invierno debido a que el queso se produce exclusivamente en el invierno y fue consumido en el área donde se presentaron los casos. A finales de noviembre de 1987, todos los productos fueron retirados del mercado. Esto se convirtió en una medida efectiva de control ya que el número de los casos nuevos en el área disminuyó substancialmente y en 1988 no se registró ningún caso nuevo causado por la cepa epidémica. De manera interesante, un estudio de 25 casos durante un período de 15 meses de enero de 1983 a marzo de 1984, 10 de 14 casos en adultos se presentaron en individuos sanos. Además, 6 de estos 10 paciente inicialmente saludables, desarrollaron encefalitis, sugiriendo esto, un posible tropismo de la bacteria, al cerebro de los adultos sanos (NACMCF, 1991).

Otros quesos mas se han relacionado a brotes de listeriosis: El queso Azul Danés en 1989 a 1990 en Dinamarca con 26 casos, el queso Brie de Meaux en 1995 en Francia con 33 casos y el queso Pont l' Eveque en 1997 también en Francia con 14 casos (Ryser, 1999a). Mientras que el queso fresco estilo-Mexicano por segunda ocasión participó como vehículo de un brote de listeriosis, ya que entre octubre del 2000 y enero del 2001, en Carolina del Norte, EUA, se identificaron 12 casos de la enfermedad, todos los pacientes eran hispanos; 11 mujeres de edad promedio de 21 años, de origen mexicano y 1 anciano de 70 años inmunocomprometido. Diez de las mujeres estaban

embarazadas y la infección por *L. monocytogenes* ocasionó 5 mortinatos, 3 partos prematuros y dos recién nacidos infectados. La onceava mujer tenía 5 meses de posparto (Boggs *et al.*, 2001).

Once brotes más (8 en Europa, 2 en EUA y 1 en Australia) se han registrado de 1987 a 1997, donde se ha implicado al paté en dos de ellos (366 casos), a la lengua de puerco en jalea (279 casos) y al maíz dulce, el cual ocasionó el mayor brote de listeriosis conocido hasta hoy con 1594 casos (Ryser, 1999a).

Además de los brotes que han estado relacionados a un alimento determinado, se han presentado otros brotes en los que ya sea uno o más alimentos fueron asociados solo epidemiológicamente. En estos brotes han destacado los siguientes puntos: 1) Un episodio en Nueva Zelanda en 1980, fue el primero en implicar al pescado o los productos del mar en un brote de listeriosis. 2) En el brote de Filadelfia, no se implicó a ningún producto individual, se encontraron múltiples serotipos (4b, 1/2a, 1/2b y 3b) y tipos isoenzimáticos (11 tipos) y no se logró aislar *L. monocytogenes* de ninguno de los alimentos consumidos por los pacientes (Farber y Peterkin, 1991). Todos estos factores junto con el hecho de que en los pacientes se presentó una tasa elevada de síntomas entéricos, permitió lanzar la hipótesis de que un organismo infectante (bacteria y/o virus) pudo haber precipitado o disparado la multiplicación de *Listeria spp.* presente en el intestino (Cox, 1989a; Farber y Peterkin, 1991). En el brote de Boston, la mayoría de los pacientes experimentaron también síntomas gastrointestinales. Sin embargo en este brote, solo estuvo involucrado un serotipo (4b). Es importante considerar pues, que en la adquisición de brotes de listeriosis por una comunidad, pueden influir en algunos casos otros factores diferentes a un alimento contaminado (Farber y Peterkin, 1991).

Casos esporádicos de listeriosis asociados al consumo de alimentos.

Si bien se han presentado importantes brotes de infección invasiva causados por *L. monocytogenes* y que han estado asociados con la ingestión de diversos alimentos contaminados, en los EUA (y muy probablemente en el resto del mundo), la mayoría de las listeriosis ocurren como casos esporádicos o aislados (CDC, 1992).

En el cuadro 5 se enlistan casos de listeriosis esporádica transmitida por alimentos. Se debe tomar en cuenta que en algunos casos la verdadera fuente de la infección continúa en duda, ya que, ya sea que no se dispuso del alimento en paquetes sin abrir o que éstos no contenían la misma cepa (Farber y Peterkin, 1991).

Estudios epidemiológicos recientes indican que una porción sustancial de listeriosis esporádica es transmitida por alimentos y se ha asociado al consumo de "hot dogs" sin recalentar, pollo insuficientemente cocido, varios tipos de quesos frescos y alimentos obtenidos del mostrador de tiendas de ultramarinos (CDC, 1992).

Se desconoce la cantidad de casos de listeriosis transmitida por alimentos que se manifestaron solo como un tipo leve de gastroenteritis, pero es de esperarse un número elevado. Es interesante el hecho de que de los 15 casos de listeriosis esporádica en los cuales se conocía el estado de salud de las personas, 7 se presentaron en individuos sanos (Cuadro 5) (Farber y Peterkin, 1991).

Dosis mínima infectante.

Se desconoce hasta el momento la cantidad mínima de células patógenas de *L. monocytogenes* que deben ser ingeridas para causar enfermedad en individuos ya sea normales o susceptibles. En el cuadro 6 se enlistan casos en los que se ha estimado aproximadamente el número de células que causó la enfermedad (Farber y Peterkin, 1991). En el brote de California por queso Jalisco la dosis mínima infecciosa estuvo en el orden de 10^2-10^4, y de los 142 casos, 48 eran inmunocomprometidos, mientras que en

Cuadro 5. Casos esporádicos de listeriosis Transmitidos por alimentos

ALIMENTO	PACIENTE (EDAD,SEXO) [a]	ESTADO DE SALUD	REFERENCIA
Pescado	54 A,F	Desconocido	Facinelli, *et al.* 1989
Nuggets de pollo cocido	52 A,F	Lupus[b]	Kaczmarski, *et al.*1989
Queso	66 A.M	Enf. cardíaca,diabetes, alcohólico	Farber, *et al.* 1990
Tabletas de alfalfa	55 A,M	Hepatitis crónica[c]	Farber, *et al.* 1990
Salchicha de pavo	61 A,F	Cáncer	Barnes, *et al.* 1989
Queso	36 A,F	Saludable	Bannister, 1987
Requesón	40 A.F	Saludable	Azadian, *et al.* 1989
Pollo cocido y refrigerado	31 A,F	Embarazada	Kerr, *et al.*1988
Cuajo vegetal	29 A.F	Embarazada	Kerr, *et al.* 1988

[a]: A = año, D = DíAS, F = Femenino, M = Masculino

[b] : Paciente tratado con esteroides

[c]: Paciente tratado con esteroides y antiácidos

Continúa . . .

. . . Continuación

ALIMENTO	PACIENTE (EDAD,SEXO) [a]	ESTADO DE SALUD	REFERENCIA
Leche humana	24 D,F	Saludable	Svabic-Vlahovic, *et al.* 1988
Salchichas caseras	- - -	Desconocido	Cantoni, *et al.* 1989
Champiñones salados	80 A,M	Saludable	Juntilla, *et al.* 1989
Embutidos de carne y arroz	>55 A	Saludable	Anónimo. 1990
Leche cruda	76 A,F	Falla renal crónica	Vogt, *et al.* 1990
Hueva de bacalao (ahumada)	38 A,F	Enf. debilitante	Rocourt, 1991
Helado	64 A,M	Saludable	Rocourt, 1991
Salchicha de puerco	43 A,M	Saludable	Parodi, *et al.* 1990

[a] : A = Año, D = Días, F = Femenino, M = Masculino

Fuente: Farber y Peterkin, 1991

Cuadro 6. Dosis mínima infecciosa y periodo de incubación en Listeriosis transmitida por alimentos

DESCRIPCION DEL PACIENTE BROTE [a]	CONDICION	ALIMENTO	DOSIS	SINTOMAS	PERIODO DE INCUBACION
59 A,F	Saludable	Queso	$2.7 X10^6$	Leve	D
40 A,F	Saludable	Requesón	3.4×10^9	Meningitis	< 24 h
Brote, queso Jalisco	48 inmunocopmprometidos de 142 casos	Queso	$10^2 - 10^4$	Severo, variado	31 - 35 d rango (1-91d)
D	D	Salchichas caseras	$2.7X10^6/g$	Meningitis	16 - 18 h
80 A,M	Saludable	Champiñones salados	$3.8 X 10^6/g$	Septicemia	D
61 A,F	Cáncer	Salchicha Frankfurt	$>1.1 X10^3/g$	D	D
64 A,M	D	Helado, crema fresca	$1 X 10^6/g$	D	2 días
F (2)	Embarazo	Camarón [b]	D	Leve	19 - 23 días
52 A,F	Esteroides, lupus	Nuggets de pollo	D	Severo	3-5 días
29 A,M	Saludable	Nuggets de pollo	D	Leve	3-5 días

[a]: Abreviaturas: A, = años; F = Femenino; M = masculino; D = desconocido
[b]: Camarones asociados sólo epidemiológicamente. 9 individuos reunieron la definición de caso para enfermedad Periodo de incubación calculado sólo para 2 embarazadas.

FUENTE: Farber y Peterkin, 1991

casos de listeriosis esporádica en personas de condición saludable la cifra osciló entre 10^6-10^9 (Farber y Peterkin, 1991).

Es de esperarse que el número de células que causa la enfermedad varíe tremendamente dependiendo de una variedad de factores, siendo los más importantes las diferencias entre las cepas bacterianas y la susceptibilidad del huésped (Farber y Peterkin, 1991). Al parecer, sin embargo, la mayoría de individuos susceptibles sanos, consumen diariamente alimentos que contienen *L. monocytogenes* en pequeñas cantidades, sin llegar a enfermarse. Esto se debe por lo menos en parte a que la mayoría de las personas normales portan células T con reactividad a *Listeria sp*, probablemente como un resultado de infección subclínica ya sea por *Listeria sp*, o por otras bacterias grampositivas que comparten antígenos con *Listeria sp* (Farber y Peterkin, 1991).

Numerosos estudios con varios modelos animales han demostrado que únicamente la administración de una elevada inoculación oral o la reducción de la flora normal microbiana pueden conducir a una colonización listérica (Farber y Peterkin, 1991).

La indicación de que la cantidad riesgosa de *L. monocytogenes* puede ser muy baja quizás entre 100 y 1000 células, como en *Salmonella,* cobra mayor impacto en los productos lácteos líquidos, ya que un cuarto de galón puede contener tal cantidad de células, si la leche fuera contaminada aún con pequeños números de listerias y enseguida se mantuviera refrigerada el tiempo suficiente para que la bacteria se multiplique, entonces será posible que un individuo ingiera en sólo un día 100-1000 listerias transmitidas por leche (Rosenow y Marth, 1987).

Los sistemas de tipificación han empezado a definir cepas de *L. monocytogenes* que pueden ser más virulentas que otras y requieren quizás una dosis infectante más baja para causar la enfermedad. Las cepas con mayor virulencia pueden ser las responsables de los brotes en pacientes que

están más sanos, cuando se comparan con pacientes que desarrollan listeriosis esporádica (Schlech III, 1992).

Tratamiento

La terapia antimicrobiana óptima para todas las manifestaciones clínicas de listeriosis no ha sido aun establecida en ensayos clínicos controlados y permanece como un tema controversial (Gellin y Broome, 1989). Sin embargo el tratamiento a base de ampicilina o penicilina ha sido recomendado como tratamiento de elección (Southwick, 1996), pero la respuesta puede ser lenta debido a la pobre penetración celular que presentan. Anteriormente algunos expertos habían propuesto el empleo de ampicilina en combinación con un aminoglucósido, como la gentamicina (Gellin y Broome, 1989; Jones, 1990; Larsson *et al.*, 1985), hoy se sabe que estos últimos no ayudan a incrementar la eficacia de la penicilina y debe evitarse su uso (James *et al.*, 1985). El empleo del cloranfenicol y la tetraciclina, por su parte, han estado asociados a tasa altas de fracaso en pacientes con la enfermedad, por lo que no son recomendados (Southwick, 1996). Varios estudios han mostrado la efectividad del sulfametoxasol y trimetoprim para tratar pacientes con listeriosis y que son alérgicos a la penicilina. Esta combinación además de ser bactericida, alcanza niveles adecuados en suero y líquido cerfalorraquídeo (Anónimo, 1987; Armstrong y Fung, 1993). Ya que *L. monocytogenes* puede multiplicarse en las células de los mamíferos, antibióticos que penetran, concentran y retienen su actividad en macrófagos, están siendo considerados actualmente. El sulfametoxasol-trimetoprim dado con rifampicina o ciprofloxacina son una alternativa potencial que aunque no ha sido evaluada resulta muy atractiva (Gellin y Broome, 1989; Jones, 1990). Si bien la resistencia de *L. monocytogenes* a estos agentes es rara, el aislamiento de cepas resistentes a estreptomicina, eritromicina, cloranfenicol y tretraciclina hechos a partir de casos clínicos (MacGowan *et al.*, 1990; Poyart-Salmeron *et al.*, 1990; Quentin *et al.*, 1990; Schuchat *et al.*, 1991) y los obtenidos de alimentos con resistencia a

estreptomicina, tetraciclina, meticilina, kanamicina, rifampicina, eritromicina, gentamicina y sulfametoxasol (Facinelli *et al.*, 1991; Schuchat *et al.*, 1991), demandan ser cautelosos en su prescripción sin el estudio correspondiente de la susceptibilidad a ellos.

Incidencia de *Listeria* en productos lácteos.

La implicación epidemiológica de la leche pasteurizada en el brote de listeriosis en Massachusetts en 1983, seguido del gran brote en los Ángeles en 1985 atribuido al queso tipo Mexicano condujo al establecimiento por la FDA de una metodología estandarizada para la detección de *L. monocytogenes*. Estos eventos desencadenaron en EUA y otros países, numerosos estudios tendientes a conocer la frecuencia y dinámica de este microorganismo en los productos lácteos.

a) Incidencia en leche cruda y leche pasteurizada.

Resultados de los estudios realizados en estos productos en diversas partes del mundo se presentan en el cuadro 7.

Según Farber y Peterkin (1991), excluyendo los datos de España, la incidencia total de *L. monocytogenes* en leche cruda nivel mundial parece estar alrededor del 2.2 %. Por lo que la leche cruda debe ser considerada por los procesadores del producto como una fuente de contaminación que llega a la planta.

b) Incidencia de *Listeria* en quesos.

Genigeorgis *et al.* (1991), analizaron 100 muestras de quesos blandos estilo hispano producidos y vendidos ilegalmente en California, utilizando el método FDA modificado con un segundo enriquecimiento incubado a 4 °C por 15 días. Ellos reportan dos muestras con *L monocytogenes* y 2 más con *L. innocua.*

Tham *et al.* (1988), cuantificaron *L. monocytogenes* en quesos blandos importados de dos marcas, una elaborada con leche pasteurizada y la otra a partir de leche cruda, ambos tipos de quesos habían sido reportados positivos a *L. monocytogenes*. Emplearon un método de enriquecimiento convencional

Cuadro 7. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche[1]

PRODUCTO	No. DE MUESTRAS	% POSITIVAS	PAIS	REFERENCIAS
Leche cruda	77	18.2	Turquia	Sharif y Tunail, 1991.
Leche cruda	137	4.37	Holanda	Beckers *et al.*, 1987
Leche cruda	95	45.3	España	Dominguez-Rodrlguez *et al.*, 1985
Leche cruda	200	4.0	EUA	Liewen y Plautz, 1988
Leche cruda	650	4.2	EUA	Lovett *et al.*, 1987
Leche cruda	361	3.6	Inglaterra y Gales	Greenwood *et al.*, 1991
Leche cruda	292	4.1	EUA	Rohrbach *et al.*, 1992
Leche cruda	121	12.0	EUA	Hird, 1987
Leche cruda	540	2.6	Escocia	Fenlon y Wilson, 1989
Leche cruda	67	44.7	España	Fernández, 1987
Leche cruda	317	1.3	Suiza	Breer y Shopfer, 1989
Leche cruda	206	0.5	Australia	Venables, 1989
Leche cruda	256	1.6	Canadá	Davidson *et al.*, 1989
Leche cruda	455	1.3	Canadá	Farber *et al.*, 1988
Leche cruda	71	0.0	Nueva Zelanda	Stone,1987
Leche cruda	80	3.8	Hungría	Rodler y Körbler, 1989
Leche cruda	40	0.0	Italia	Massa *et al.*, 1990
Leche cruda	NR[2]	3.3	Checoslovaquia	Microba, 1992
Leche cruda	84	0.0	EUA	Petterson *et al.*, 1989
Leche cruda	100	0.0	México	Luisjuan-Morales *et al.*, 1995
Leche cruda	1300	13.0	México	Vázquez-Salinas *et al.*, 2001
Leche pasteurizada	22	0.0	Turquía	Sharif y Tunail, 1991
Leche pasteurizada	1039	1.1	Inglaterra y Gales	Greenwood *et al.*, 1991
Leche pasteurizada	28	21.4	España	Fernández *et al.*, 1986
Leche pasteurizada	14	0.0	Canadá	Farber *et al.*, 1989

1. Leche de vaca 2. No reportado

(a 4 °C), seguido de recuento por siembra por superficie en placas de agar sangre de caballo. El queso elaborado con leche pasteurizada contenía $7.5X10^5$ ufc/g de *L. monocytogenes* serotipo 1/2 b en la capa superficial y 100/g en el centro. El queso fabricado con leche cruda presentó en la superficie $4X10^6$ ufc/g y en el centro $1X10^6$ ufc/g del mismo serotipo. El queso hecho de leche pasteurizada contenía menos de 10 coliformes por gramo.

McLauchlin *et al.* (1990), aislaron *L. monocytogenes* de 16 de 25 muestras de queso de cabra que se venden al menudeo y de 12 de 24 muestras de queso de cabra obtenidas directamente de una fábrica implicada en un caso de listeriosis. *L. innocua* se aisló de 10 muestras de queso, 2 de las cuales no contenían otras especies de *Listeria*. Los niveles de *L. monocytogenes* fueron bajos en el queso recién salido de producción (< 10/g), pero más elevados (10^5-10^7 ufc/g) en 6 de las 16 muestras obtenidas del menudeo.

Pini y Gilbert (1988), estudiaron 222 muestras de queso blando vendidas al menudeo, en el Reino Unido e importadas de 7 países, se utilizó el enriquecimiento en frío y una modificación del método FDA, 10% de los quesos contenían *L. monocytogenes* a niveles de $<10^2$ ufc/g a 10^5 ufc/g. La medición por países fue: Italia (16%), Francia (14%), Chipre (10%) y el Reino Unido (4%). Se aislaron sólo 2 serotipos (1/2 y 4b), algunas muestras contenían ambos. *L. innocua* fue la única otra especie de *Listeria sp* encontrada.

En una investigación realizada por Beckers *et al.* (1987), en Holanda, se detectó mediante un método de recuento, el 10.14% (7 de 69) de las muestras de queso blando importado, contaminadas con *L. monocytogenes* a niveles de 10^3 y 10^6/g. La bacteria se detectó también en otras 3 muestras mediante enriquecimiento. Todas las muestras positivas habían sido elaboradas con leche cruda.

Las incidencias de *L. monocytogenes y Listeria spp.* en quesos reportadas por Greenwood *et al.* (1991), en su estudio realizado en Inglaterra

y Gales fueron: queso blando sin madurar de leche de vaca 1.1% (4 de 366) y 4.8%, queso blando madurado de leche de vaca 8.2% (63 de 769), queso duro de leche de vaca 1.5% (1 de 66) y 4.8% (58 de 1201 incluyendo los 3 tipos de queso), queso de leche de cabra 4.6% (22 de 476) y 2.1%, queso de leche de oveja 0.7% (1 de 141) y 1.4% respectivamente.

En un estudio realizado en México D.F., por Vizcaíno y Mustre (1992), se reporta un 2% (2 de 100) de incidencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos del mercado de Chalco, Edo. de Méx. La bacteria se investigó en 1 gramo de muestra simultáneamente por preenriquecimiento a 4°C en caldo nutritivo más 1% de glucosa, enriqueciendo periódicamente en CEL y Caldo Universidad de Vermont modificado (UVM) y por enriquecimiento en CEL y UVM incubando a 37 °C por 24 h, seguido de aislamiento en agar LMM y agar LPM.

Otras incidencias en quesos reportadas por distintos autores y recopiladas por Farber y Peterkin (1991), se presentan en el cuadro 8.

c) Incidencia de *Listeria* en otros productos lácteos.

Greenwood *et al.* (1991), en el estudio realizado en Inglaterra y Gales reportan incidencias de *L. monocytógenes y Listeria spp.* en crema de leche cruda de vaca, de 4.2% (2 de 48) y 8.3%, en crema pasteurizada de vaca 0.0% (0 de 40) y 0.0%, yogurt 2.2% (4 de 180) y 0.0%, helado 2.0% (3 de 150) y 1.3% respectivamente.

Farber *et al.* (1989), en un estudio realizado en la mayoría (114 de 147) de fábricas de helado en Canadá, reportan en helado, mezcla de helado y una novedad de helado, incidencias de *L. monocytogenes* de 0.25% (1 de 394), 0% (0 de 85) y 1.96% (1 de 51) respectivamente.

En la investigación realizada por Massa *et al.* (1990), reportan 0% (0 de 20) de *L. monocytogenes* en mantequilla.

Cuantificación de *Listeria* en productos lácteos.

Diversos autores se han avocado a estudiar los niveles de *Listeria* en quesos blandos elaborados ya sea con leche cruda o pasteurizada y con o sin

Cuadro 8. Incidencia de *L. monocytogenes* en quesos

PRODUCTO	No. DE MUESTRAS	No. (%) POSITIVAS A *L. monocytogenes*
Queso duro	88	0 (0)
Queso semiduro	205	4 (2.0)
Queso curado moho-blanco	261	7 (2.7)
Queso superficie roja	343	33 (9.6)
Otros quesos	107	6 (5.6)
Quesos blandos	338	6 (1.8)
Varios quesos	100	2 (2.0)
Quesos blandos	121	2 (1.6)
Queso blando y semiblando	374	2 (0.5)
Queso	509	29 (5.7)
Queso	140	1[a] (0.7)
Queso	89	8 (9.0)
Queso (misma fábrica)	23	20 (87.0)
Queso	350	3 (8.9)

[a]: Queso de cabra hecho en casa

Fuente: Farber y Peterkin, 1991

cultivo iniciador, los resultados de algunos de estos trabajos se presentan en el cuadro 9, en donde se aprecia que los niveles de *Listeria* mínimos y máximos reportados fueron: $<1x\ 10^2$ y $2.9x\ 10^7$ (Beckers *et al.*, 1987; Eilertz *et al.*, 1993; Pini *et al.*, 1988; Tham *et al.*, 1988).

Dinámica de *L. monocytogenes* en productos lácteos.

L. monocytogenes posee la capacidad para sobrevivir durante la fabricación y maduración de una variedad de quesos, haciéndolo mejor en quesos como el Camembert y peor en productos como el queso Cottage (Cuadro 10). La bacteria generalmente se concentra en la cuajada, y sólo una pequeña cantidad de *Listeria* se encuentra en el suero. Al parecer el desarrollo del germen se reduce pero no se inhibe totalmente por los cultivos lácticos iniciadores utilizados en la elaboración del queso. Se ha observado también que el microorganismo sobrevive en productos como la mantequilla cultivada, mantequilla y hasta en yogurt (Cuadro 8). Se han obtenido resultados contradictorios con relación al tiempo, que *L. monocytogenes* puede sobrevivir en yogurt almacenado, esto se debe principalmente a las diferencias en los métodos de recuperación de los microorganismos dañados, a las cepas utilizadas y al contenido de sólidos y pH del producto. Sin embargo, parece ser que *L. monocytogenes* puede sobrevivir en algunos casos por más de 30 días después de la fabricación del yogurt a pHs tan bajos como 4.0. *L. monocytogenes* generalmente es más persistente que los coliformes en mantequilla, yogurt y probablemente en el queso. Así los productos lácticos libres de coliformes no se encuentran necesariamente libres de contaminación por *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* crece bien en los productos lácteos líquidos, contaminados tanto de forma natural como artificialmente (incluyendo leche de soya) a temperatura entre 4 y 35 °C. El germen desarrolla en la presencia de las bacterias psicrótrofas comunes de la leche, y se ha demostrado que la presencia de *Pseudomonas* en leche puede aumentar el desarrollo de *L. monocytogenes*. *L. monocytogenes* también sobrevive en la leche en polvo fermentada con *Streptococcus cremoris o S.*

Cuadro 9. Niveles de *Listeria monocytogenes* en quesos blandos

CARACTERISTICAS		UFC/g *	AÑO	AUTORES
Queso Fabricado con:				
Leche Cruda		1×10^3 a 1×10^6	1987	Beckers *et al.*, 1987
Leche Cruda		$< 10^2$ a 1×10^4	1988	Pini *et al.*, 1988
Leche Pasteurizada		1×10^2 a 1×10^4		
Sin dato		$< 10^2$ a 1×10^5		
Leche Cruda	superficie	4×10^6	1988	Tham *et al.*, 1988
	centro	1×10^6		
Leche Pasteurizada	superficie	7.5×10^5		
	centro	1×10^2		
Leche de cabra sin cultivo iniciador		1×10^3 a 2.9×10^7	1993	Eilertz *et al.*, 1993
Leche de cabra con cultivo iniciador		8×10^2 a 9×10^3		

* UFC/g = Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra.

Cuadro 10. Sobrevivencia y/o desarrollo de *L. monocytogenes* en productos lacteos

	FABRICACION		ALMACENAMIENTO O MADURADO	
PRODUCTO	Sobrevivencia[a]	Desarrollo[b]	Sobrevivencia[a]	Desarrollo[b]
Queso maasdam	+	+	+	+
Queso azul	+	+	+	-
Queso empacado en frío	+	-	+-	-
Queso cheddar	+	+	+-	-[d]
Queso colby	+	++	+	-
Mantequilla	+	-	+-	++
Queso feta	+	+	+	+[j]
Queso camembert	+	++	+-	++[e]
Queso cottage	+	++	+	-
Yogurt[h]		-	+-	-
Yogurt[i]	+	+	+-	-
Yogurt			+[k]	-
Mantequilla madurada			+[l]	-

a ±, la cantidad disminuyó durante el madurado

b -, sin desarrollo; +, desarrollo limitado; ++, buen desarrollo

c, el periodo de sobrevivencia varió dependiendo del uso de un conservador o agente acidificante

d, durante las fases iniciales del madurado del queso cheddar a pH 5.0 a 5.1, pudo haber algún desarrollo de los microorganismos usados

e, algunas cepas solamente

f, desarrollo limitado con algunas cepas solamente, durante la fase inicial del madurado

g, después de 18 días de madurado

h, los resultados son para un inóculo inicial de 10^2 ufc/g de yogurt, con un inóculo alto (10^7 ufc/g) *L. monocytogenes* pudo recuperarse hasta 9 días después de la fabricación

i, inóculo inicial, 1 X 10^3 a 5 X 10^3 cel/ml

j, la sobrevivencia osciló entre 1 a 12 días dependiendo de la cepa y del número de experimento

k, la sobrevivencia osciló entre 18 a 26 días dependiendo de la cepa

l, la sobrevivencia osciló entre 13 a 27 días dependiendo de la cepa

Fuente: Farber y Peterkin, 1991

lactis y durante un periodo de almacenamiento del producto refrigerado. La fermentación con la bacteria termofílica *Lactobacillus bulgaricus* se encontró que disminuye más el desarrollo y sobrevivencia de *L. monocytogenes* que las fermentaciones con cultivos iniciadores lácticos mesofílicos. Al parecer en el suero, el desarrollo de *L. monocytogenes* es mayor que su desarrollo en otros productos lácteos líquidos, su desarrollo en suero a 6 °C estuvo grandemente influenciado por 2 factores, el pH y la presencia de o ausencia de una cepa de *Penicillium camemberti*. El microorganismo creció más rápido en suero fermentado y a los valores más altos de pH probados (pH 5.6, 6.2 y 6.8). El desarrollo generalmente cesó en suero cultivado a niveles de pH de 5.4 o más bajos, aunque 2 de las 4 cepas probadas crecieron en suero cultivado a pH 5.4 (Farber y Peterkin, 1991).

Métodos de detección de *Listeria* en alimentos.

Resulta un reto, intentar aislar *L. monocytogenes* de los alimentos ya que éstos pueden tener una carga elevada de otros microorganismos. Se han propuesto una gran variedad de agentes selectivos incluyendo al telurito de potasio, ácido nalidíxico y acriflavina. La refrigeración de la muestra en un medio no selectivo por períodos prolongados (más de 6 meses) puede mejorar la recuperación debido a la naturaleza psicotrófica del organismo. Mc Bride y Girard desarrollaron un agar selectivo el cual combinado con la iluminación oblicua de las colonias, sugerido por Henry, contribuyó a lograr el aislamiento de *L. monocytogenes* de alimentos. Se han desarrollado una gran variedad de medios de aislamiento para la recuperación de *Listeria* de los alimentos así como diversos estudios con el propósito de evaluar tales medios y en resumen estos estudios indican que: 1) El funcionamiento de los medios estuvo afectado por el medio de soporte; 2) Aunque el agar LMM no fue lo suficientemente selectivo, los otros medios fueron casi iguales para el recuento de *L. monocytogenes*; 3) El agar LPM fue el mejor medio de todos, para el recuento de *L. monocytogenes* en alimentos, ya que sólo inhibió el desarrollo de microorganismos de otras especies, mientras que soportó el

desarrollo de todas las cepas de *L. monocytogenes*; 4) El Agar VJM y el Agar Oxford tuvieron una ventaja sobre el LPM ya que *Listeria spp.* puede ser diferenciada visualmente de otras bacterias sin la necesidad de la iluminación de Henry; y aunque la recuperación de *L. monocytogenes* dañadas por congelación no se vio afectada por el medio de aislamiento empleado, las células dañadas por calor se recuperaron en cantidades mayores cuando se uso el Agar Despierres modificado. Aunque ningún medio ha resultado claramente como superior, el PALCAM se prefiere en Europa mientras que en Norteamérica el LPM y el Oxford son los más ampliamente usados (Farber y Peterkin, 1991).

Métodos Rápidos para detección de *Listeria* (Batt, 1999).

Las técnicas tradicionales desarrolladas desde los 1980,s para detectar y contar *L. monocytogenes*, no han sido lo suficientemente rápidas para lograr la seguridad de alimentos perecederos antes de su consumo. Actualmente se han desarrollado sistemas de prueba basados en anticuerpos (mono y policlonales) y en ácidos nucléicos para la identificación rápida de *Listeria* hasta nivel de género o especie (*L. monocytogenes).* Algunas de éstas pruebas ya están en el comercio y se pueden realizar en el mejor de los casos hasta en 24 horas, dependiendo del tipo de alimento y el nivel de sensibilidad. Estos ensayos son útiles para el rápido escrutinio cuando se tiene un número elevado de muestras. Si el método de prueba no se ha aprobado oficialmente, todas las muestras positivas deberán confirmarse por métodos microbiológicos estándar. **Pruebas inmunológicas:** a) kit ELISA (Organon-Teknika), que emplea un microtitulador de 96 pozos y un lector colorimétrico. b) Prueba de la Inmunotira que emplea receptáculo de fase sólida y un lector fluorescente (Vidas Instrument). c) Inmunoensayo con contéo colonial inmunomagnético por Vicam (Watertown, MA). **Pruebas basadas en ácidos nucléicos:** a) kit para prueba de hibridación de ADN basada en la secuencia de ARNr 16s (Genetrak Framingham, MA). Recientemente se ha incorporado una nueva solución de hibridación donde la

cuantificación final se acompaña del uso de un marcador enzimático y un lector colorimétrico. Como una alternativa al uso de secuencias blanco con un alto número de copias dentro de una célula, se han reportado métodos basados en la amplificación de ácidos nucléicos que emplean la Reacción en cadena de la ligasa (LCR), la Reación en cadena de la polimerasa (PCR) y más recientemente la secuenciación de ácidos nucléicos (NASBA). De éstos métodos el de PCR es el de mayor sensibilidad comparado con las pruebas estándar de ácidos nucléicos o inmunoensayos. Se han desarrollado una gran variedad de ensayos basados en PCR a nivel de investigación para *L. monocytogenes* para diferentes secuencias genéticas blanco, principalmente genes de virulencia, otras secuencias de ácidos nucléicos y secuencias cripticas únicas para *L. monocytogenes*. Sin embargo en el comercio existe un b) método de PCR para detectar específicamente *L. monocytogenes* de Qualicon (Wilmington, DE), al que se le han adicionado reactivos como el sistema BAX simplificando el proceso y haciéndolo mas práctico para su uso de rutina. La preferencia personal por el uso de pruebas rápidas de ácidos nucléicos o de anticuerpos para la detección de *L. monocytogenes* depende de factores como; simplicidad, costo, rápidez y sensibilidad de la prueba.

Cuantificación.

No existen métodos oficiales de cuantificación. Sin embargo, si una muestra es implicada directamente como causa de listeriosis transmitida por alimentos debe intentarse cuantificar *Listeria* antes del enriquecimiento por Cuenta Directa en Placa o por Número Más Probable usando Caldo de Enriquecimiento *Listeria*. Tales datos son de utilidad en la estimación de los valores de la dosis infectante (Lovett y Hitchins, 1989a).

Prevención y control.

El control y la prevención de las enfermedades tienen su fundamento en el conocimiento epidemiológico que se tenga de éstos.

Aunque muchos de los aspectos clínicos y microbiológicos de *L. monocytogenes* han sido bien estudiados, nuestro conocimiento de la

epidemiología de la listeriosis humana es muy limitado (Gellin y Broome, 1989), de ahí que su prevención esté aún desarrollándose (Schuchat *et al.*, 1991).

Entre las medidas preventivas que pudieran resultar efectivas para lograr tal propósito, se sugiere:

1. Difundir entre médicos, veterinarios, bacteriólogos, tecnólogos, microbiólogos y epidemiólogos, productores y procesadores de alimentos y otros afines a estas disciplinas, un conocimiento actualizado de la enfermedad.
2. Reglamentar la aplicación del Sistema de Análisis de Riesgos y Control de Puntos Críticos (HACCP) en la industria de alimentos.
3. Evitar la exposición de individuos considerados de alto riesgo (embarazadas, recién nacidos, ancianos e inmunocomprometidos) a fuentes importantes de *L. monocytogenes* (animales y su medio ambiente, alimentos crudos o insuficientemente cocidos o descontaminados, etc.).

Los métodos usados en los países desarrollados para el control de *L. monocytogenes* involucran la implementación de Sistemas de Aseguramiento de la Calidad básica como el HACCP desde la adquisición de materias primas crudas hasta el manejo de producto terminado (Farber y Peterkin, 1991).

RECOMENDACIONES A LAS AUTORIDADES DE SALUD PÚBLICA SOBRE COMO ASEGURAR LA PROTECCIÓN AL CONSUMIDOR. Los siguientes son párrafos tomados de las recomendaciones de la OMS (1988) para la prevención de la listeriosis transmitida por alimentos (Cox, 1989a).

I. Objetivos:

1. Reducir la incidencia de listeriosis transmitida por alimentos.
2. Limitar o eliminar donde tecnológicamente sea posible la contaminación de *Listeria monocytogenes* de los alimentos.
3. Aumentar la confianza de los consumidores respecto a la inocuidad de los alimentos.

II. Categorías de alimentos.

1. Alimentos crudos (como vegetales y carnes crudas).
2. Alimentos crudos modificados (como alimentos crudos mezclados con otros ingredientes tales como col rebanada, salchicha fermentada, leche cruda y queso).
3. Alimentos procesados (sujetos a un proceso listericida) con un manejo subsecuente (como ciertos tipos de quesos y carnes comerciales procesados, rebanadas o alteradas en los expendios).
4. Alimentos procesados (sujetos a un proceso listericida) en paquetes intactos (como leche pasteurizada, productos lácteos y carnes cocidas en recipientes sellados). Tales alimentos reciben el proceso listericida en sus empaques o son asépticamente empacados inmediatamente después de la aplicación del proceso listericida.

III. Recomendaciones específicas.

1. Considerar el retiro del mercado de alimentos de la categoría 4 que se encuentren contaminados con *L. monocytogenes*.
2. Retirar del mercado alimentos de cualquier categoría que se haya demostrado que están causalmente asociados con casos de listeriosis humana.
3. Cuando el retiro de alimentos del mercado, esté indicado, estudiar detalladamente todas las implicaciones y posibles consecuencias antes de su ejecución. Tales decisiones deben basarse en la mejor información científica disponible y hacerse sólo después de un cuidadoso análisis de riesgos, con la intención de mantener la confianza del consumidor en los productos que no pueden estar totalmente libres de *Listeria*.

IV. Recomendaciones a la industria de alimentos.

Planteamiento de objetivos.

1. A corto plazo:
   a) Asegurar la inocuidad de los alimentos.

b) Reducir o eliminar, donde tecnológicamente sea posible, la contaminación por *L. monocytogenes* en los alimentos de la categoría 3.

c) Con oportunidad elevar la educación, adiestramiento y prevención en la industria alimenticia.

2. A mediano plazo:

a) Reevaluar o verificar continuamente los procedimientos HACCP para asegurar la inocuidad de los alimentos procesados.

3. A largo plazo:

a) Superar el problema de *L. monocytogenes* en aquellos alimentos que no fueron sujetos a tratamientos listericidas (por ejemplo los de la categoría 2) pero que previamente se han aceptado como seguros.

b) Extender la educación y el adiestramiento a otras áreas de la industria alimenticia.

V. Recomendaciones específicas a la industria de alimentos.

1. Promover la implementación del HACCP y asegurar la inocuidad de los productos alimenticios mediante la educación y motivación de todos aquellos que trabajan en la industria alimenticia.

2. Aplicar la estrategia del HACCP para:

a) Identificar patógenos asociados con los materiales crudos y el medio ambiente de producción.

b) Identificación de fuentes críticas de contaminación y eliminarlas donde sea posible.

c) Identificación de vehículos de contaminación y eliminarlos.

d) Identificar oportunidades de sobrevivencia y desarrollo de microorganismos indeseables en el medioambiente de las fábricas y en los productos.

Control en plantas de lácteos

Muchos de los problemas de contaminación del producto final con *Listeria* han sido por contaminación postproceso (Farber y Peterkin, 1991).

Afortunadamente existen prácticas que ayudan a reducir la posibilidad de que los alimentos se contaminen con *L. monocytogenes.* El primer paso consiste en reducir al mínimo la contaminación existente en granjas, verificar la salud de las vacas, que el alimento ensilado tenga un pH igual o menor a 5.0. Todas las superficies en contacto con la leche deberán ser higienizadas justo antes de su uso y además llevar un buen control de los insectos. Para controlar *L. monocytogenes* en las plantas procesadoras deben implementarse buenas prácticas de saneamiento. *Listeria* puede encontrarse en los abastecimientos de agua sin clorar, en la tina de limpiado, en las patas huecas del equipo, sobre estructuras, refrigeradores, transportadores, en la superficie de ingredientes así como en las charolas de acero inoxidable. Los desinfectantes comúnmente usados en las plantas de alimentos (cloro, ácidos aniónicos, iodóforos y compuestos cuaternarios de amonio) son efectivos contra *Listeria*, pero sólo cuando se aplican sobre las superficies limpias. Ya que algunos detergentes neutralizan los compuestos cuaternarios de amonio; antes de desinfectar las áreas, éstas deben enjugarse con cloro. Los pisos y rejillas del drenaje son la fuente principal de *Listeria* en las plantas de lácteos y de otros alimentos; de aquí que no deberá de haber rejillas cerca del área de llenado y empaque, los artículos que absorben el agua (trapos, esponjas, etc.) no deben de usarse para limpiar, ya que pueden albergar este patógeno. Los materiales porosos (madera, etc.) pueden albergar *Listeria*, por lo que deben usarse materiales impermeables (azulejo, metal y concreto). Deben evitarse los aerosoles provocados por mangueras de alta presión, bombas y formación de condensados. Los sistemas de aire acondicionado, calefactores y ventilación, pueden ser vehículos para que el alimento se contamine, por lo que deben de estar sujetos a un mantenimiento adecuado. Para lograr una correcta pasteurización, los tanques pasteurizados deben estar equipados con termómetros y con calentadores de espacio de aire, para mantener la temperatura de este lugar arriba de 2.8 °C (5 °F) de la temperatura mínima de pasteurización. Las placas del pasteurizador de Alta

Temperatura en Corto Tiempo, deben examinarse para detectar grietas por presión, pequeños agujeros, etcétera. La clarificación y remoción de los leucocitos y otras células deberá hacerse antes de la pasteurización para remover la mayoría de las listerias intracelulares (y en consecuencia más resistentes al calor). Los sistemas de enfriamiento tanto de agua como por glicol deben de ser examinadas para evitar una posible contaminación. Las operaciones de reproceso o de alivio son procedimientos muy riesgosos. Los productos que se hayan descartado de la fábrica de lácteos no deberán regresarse y ser repasteurizados (Pearson y Marth, 1990).

Prácticas del personal (NACMCF, 1991).

El personal puede ser una importante fuente de contaminación a los productos. Las personas se contaminan por productos alimenticios crudos o por fuentes indirectas en su medio ambiente inmediato de operación. Todas las plantas deben implementar las siguientes actividades con sus trabajadores.

- Educar a todo el personal en relación a los programas de Buenas Prácticas de Manufactura (GMP) y HACCP y de sus responsabilidades individuales para seguir las prácticas sanitarias.
- Proporcionar una constante retroalimentación y enfocar la supervisión sobre los programas de GMP y HACCP Involucrar al personal de línea para unificar esfuerzos y mejorar las prácticas de saneamiento.
- Utilizar toda la tecnología disponible para ayudar a que el personal esté enterado y mantenga las condiciones sanitarias tales como:
  a. Tapetes sanitarios y recipientes p/desinfección de manos.
  b. Guantes/malla, cubrepelo, batas/mandiles.
  c. Separar los productos sanitarios en contacto con los trabajadores y el personal no sanitario y prohibir el contacto entre estas áreas incluyendo equipo, trabajadores, personal de supervisión e inspectores.

- Eliminar las fuentes de contaminación del medio ambiente de los productos "listos para comer".
- Proporcionar adiestramiento y supervisión para ayudar a los trabajadores a mantener las prácticas sanitarias.
- Proporcionar asesoría de apoyo para los programas de GMP y HACCP.

En países desarrollados como los EUA, a pesar de haber realizado los mejores esfuerzos, la industria de alimentos no ha sido capaz de eliminar totalmente a *L. monocytogenes* de los alimentos cocinados. Estudios realizados entre 1987 y 1990 indicaron que se hizo una mejora substancial en la incidencia total en muchas categorías de alimentos. Pero aún continúa el debate acerca de la capacidad para eliminar completamente el microorganismo de la cadena alimenticia utilizando la tecnología actualmente disponible ya que la eliminación completa de *L. monocytogenes* durante la producción de la mayoría de los alimentos refrigerados no es completamente segura, el control de otras áreas de la cadena alimenticia está considerándose. Es necesario que se preparen y distribuyan programas educativos orientados a todos los consumidores especialmente a aquellas personas consideradas susceptibles a la enfermedad. Los manejadores de alimentos comerciales necesitan enterarse de su papel en el control de *L. monocytogenes* y la seguridad de los alimentos. El adiestramiento y las medidas de control requerirán implementaciones adecuadas para asegurar su utilización. Toda la tecnología que indica abuso de temperatura, previene el desarrollo bacteriano o elimina la contaminación, puede traer mejoramiento posterior en el control total del organismo. El sistema de HACCP proporciona una vía para incorporar nuevas tecnologías para mejorar su completa efectividad total (NACMCF, 1991).

El queso Adobera

El queso Adobera al parecer tiene décadas de existencia, y aun posiblemente siglos. Es un queso típico mexicano, una verdadera creación nacional, que es elaborado y altamente apreciado no solamente en el estado

de Jalisco (de donde probablemente es oriundo) si no de otros estados del país como Guadalajara, Zacatecas e Hidalgo. Es un queso elaborado con leche cruda de vaca, fresco o ligeramente añejado, de pasta blanda, acidificado por la microflora natural de la leche y prensado ligeramente. Dado su pH último bajo de alrededor de 5.2, se comporta como los quesos de pasta hilada (filata), fundiéndose fácilmente al aplicarle calor. De alguna forma este queso recuerda el típico queso de pasta filata Italiana, el Mozzarella. Se presenta en el mercado en prismas rectangulares (de ahí su nombre, que recuerda al "adobe" para construcción) con dos presentaciones: una con un peso de 500 gr y la otra con uno de 1 kg., aproximadamente; la segunda corresponde a un prisma de producto de alrededor de 15 x10 x 5 (ó 6) cm. Este formato es más común que el pequeño. El Adobera muestra un color blanco o ligeramente amarillento, una pasta un tanto granulada (aunque fina) fácilmente tajable. Cuando está muy oreado o ligeramente añejado, la pasta se torna muy friable (desmenuzable fácilmente). El color esta influenciado por la riqueza en grasa de la leche con que se elabora; si ésta es ligeramente descremada o semidescremada el color del producto es más blanco que si se emplea leche entera. También depende de la época del año (época de lluvias o de sequía), ya que ésta influye sobre el tipo de forraje que consumen las vacas y éste en el color (por la presencia de carotenoides). Un análisis bromatológico grueso de este queso arrojó la siguiente composición: porcentaje de agua, sólidos totales, grasa, proteínas y cenizas de 47.0, 53.0, 22.5, 23.4, 3.4 respectivamente, así como un pH de 5.1. Unos pasos interesantes durante el proceso de elaboración de este queso son: A) El trabajo del grano, más bien corto (alrededor de 10 min) por lo que el secado de la pasta se efectúa por sinéresis. B) La chedarización (acidificación en masa) de la pasta, que dura varias horas, hasta un pH debajo de 5.5. C). El desmenuzado, molido fino y salado en masa. C) El moldeado en moldes de madera prismático-rectangulares. D) El prensado prolongado de la pasta (entre 7 y 24 horas). Si se redefiniera, se diría que el Adobera es en realidad un queso fresco de

pasta chedarizada molida, no amasada en caliente ni hilada. Debido al prolongado tiempo empleado para chedarizar la pasta, el método tradicional para elaborar este queso puede ser objetable desde el punto de vista sanitario, ya que si la microflora acidificante en la cuajada no es numerosa y activa, entonces la multiplicación de coliformes toma lugar produciéndose gases y entrañando un peligro potencial por la microflora patógena presumiblemente asociada a éstos. Por lo anterior sería deseable acortar el tiempo de acidificación de la masa, premolido y salado, lo cual podría lograrse empleando un cultivo láctico, un serofermento o en todo caso, un "inóculo" de leche previamente acidificada (Villegas, 1993).

3. JUSTIFICACIÓN

3. JUSTIFICACION

1. Los brotes y casos de listeriosis asociados al consumo de alimentos, reportados en varios países durante los años ochenta, permitieron reconocer a *L. monocytogenes* como un patógeno vehículizado por alimentos y de gran importancia en Salud Pública.
2. Diversos alimentos, entre los que destacan los quesos blandos, han sido sujetos de investigación por su frecuente participación en los brotes de listeriosis.
3. Estudios realizados en Guadalajara, México, en quesos frescos no pasteurizados que se expenden en mercados, de amplio consumo popular y elaborados artesanalmente mostraron que *L. monocytogenes* frecuentemente se encuentra contaminando estos productos, con tasas que sobrepasan significativamente las reportadas en otros países para productos similares.
4. *L. monocytogenes* ha sido capaz de multiplicarse durante la fabricación y el almacenamiento en refrigeración por 21 días en queso panela inoculado artificialmente.
5. Conocer la participación del queso fresco Adobera como vehículo de *L. monocytogenes*, contribuirá al conocimiento de la epidemiología de la listeriosis en el país.
6. La información resultante apoyará la aplicación de la Norma Oficial Mexicana en lo referente al Control Sanitario de los quesos y la presencia de *L. monocytogenes.*

4. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

4. OBJETIVOS E HIPOTESIS

I. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la participación del queso fresco Adobera como vehículo de *Listeria* mediante la determinación de su frecuencia, nivel de contaminación y comportamiento en el producto.

II. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Determinar la frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso fresco Adobera elaborado con leche pasteurizada que se expende en tiendas autoservicio de la zona metropolitana de Guadalajara.

2. Conocer el nivel de contaminación por *Listeria* en el queso fresco Adobera que resulte positivo a la presencia del microorganismo.

3. Determinar el potencial de una cepa nativa de *L. monocytogenes* para sobrevivir y/o multiplicarse durante la elaboración y almacenamiento del queso fresco Adobera inoculado.

4. Detectar los cambios que se presentan en la flora láctica, pH y la acidez titulable, durante la fabricación y almacenamiento del queso Adobera inoculado con *L. monocytogenes*.

HIPOTESIS

Argumentación:

a. *Listeria* es un microorganismo ampliamente diseminado en el medio ambiente.
b. *L. monocytogenes* es un psicrótrofo capaz de sobrevivir y aún multiplicarse en una variedad de productos lácteos.
c. En los países desarrollados aún con las condiciones higiénicas de manejo de lácteos con que cuentan, la leche cruda y los derivados lácteos con frecuencia se encuentran contaminados con el microorganismo.
d. En nuestro país las condiciones de obtención, procesamiento, almacenamiento, transporte y comercialización de los productos lácteos, en particular de los quesos blandos, favorecen su contaminación con este patógeno.

Por tanto se plantean las siguientes hipótesis:

1. La frecuencia y cantidad de *Listeria* en el queso fresco Adobera que se expende en tiendas de autoservicio de la Zona Metropolitana de Guadalajara (ZMG), es mayor que la reportada en los países desarrollados para los quesos blandos.

2. En el queso fresco Adobera elaborado con leche pasteurizada e inoculado en el laboratorio, *L. monocytogenes* posee el potencial para sobrevivir y/o desarrollar el tiempo suficiente para implicar un riesgo a la salud.

5. MATERIALES Y METODOS

5. MATERIAL Y METODOS

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Alimentaria del Departamento de Salud Pública del Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad de Guadalajara.

Etapas:

1. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso fresco Adobera elaborado con leche pasteurizada que se expende en tiendas de autoservicio.
2. Nivel de contaminación por *Listeria* en el queso Adobera positivo a la presencia del microorganismo.
3. Comportamiento de una cepa nativa de *L. monocytogenes* y cambios concurrentes en la flora láctica, pH y la acidez titulable durante la fabricación y el almacenamiento del queso Adobera.

Etapa 1.- Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso fresco Adobera elaborado con leche pasteurizada que se expende en tiendas de autoservicio.

Muestreo

Con base en un muestreo probabilístico aleatorio, se estudiaron muestras de queso fresco Adobera, elaborado con leche pasteurizada, que se expenden en tiendas de autoservicio de la ZMG.

Determinación del tamaño de muestra

Universo: Los 202 expendios de queso de tiendas de autoservicio de la ZMG.

Muestras: Queso fresco Adobera elaborado con leche pasteurizada.

Diseño de la muestra:

Marco muestral: Las 8 principales cadenas de tiendas de autoservicios de la ZMG que cuentan con departamento de lácteos.

Tamaño de la muestra: Se utilizó la siguiente fórmula para estimar prevalencia con una precisión del 95 % (García de Alba, 1995).

$$n = \frac{4pqN}{(d)^2N+4qp}$$

Donde:

p=% de contaminación probable = 17 %

q= 1-P

N= número total de expendios de queso = 202

d= nivel de significancia = 0.05

n = tamaño de la muestra

$$n = \frac{4(0.17)(0.83)(202)}{(0.05)^2(202)+4(0.17)(0.83)} = \frac{114.00}{1.0694} = 106.60$$

Selección de las muestras

Las muestras se seleccionaron una vez que se clasificó la distribución de las marcas del queso a estudiar, según su presencia en los sitios de muestreo (Cuadro 11). Se incluyeron 8 de las mas importantes cadenas de tiendas de autoservicios de la ZMG. La clave, el número de tiendas (según datos del padrón de licencias de los ayuntamientos), así como la cantidad de muestras asignadas a cada cadena fue como sigue: A; 106 y 26, B; 65 y 20, C; 14 y 16, D; 7 y 19, E; 3 y 14, F; 4 y 8, G; 2 y 2 y el H;1 y 1, respectivamente.

Se recolectaron durante su venta, piezas enteras de queso Adobera (de aproximadamente un kilo), se transportaron en refrigeración al laboratorio y se procesaron dentro de las tres horas siguientes a su obtención. La porción de queso a analizar se obtuvo mediante el corte de rebanadas tipo pastel con el fin de incluir tanto los exteriores como el interior del alimento.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Listeria*

Básicamente se utilizó el procedimiento recomendado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Figura 3) (Donnely, 1999; Hitchins, 1995), que incluye un enriquecimiento en Caldo Enriquecimiento *Listeria* (CEL), aislamiento en dos medios; Agar Oxford (OXA) y en Agar cloruro de litio-feniletanol-moxalactam (LPM) con o sin esculina y fierro (Fe^{3+}) o PALCAM, e identificación bioquímica de género y especies.

Cuadro 11. Distribución del queso adobera estudiado según presencia en los sitios de muestreo

CATEGORIAS POR MARCAS	No. DE MARCAS ESTUDIADAS	No. DE MUESTRAS ESTUDIADAS POR MARCA	TOTAL ESTUDIADAS
ALTA DISTRIBUCIÓN	3	9 - 11	30
MEDIA DISTRIBUCIÓN	8	4 - 6	42
BAJA DISTRIBUCIÓN	13	1 - 3	34
TOTAL	24		106

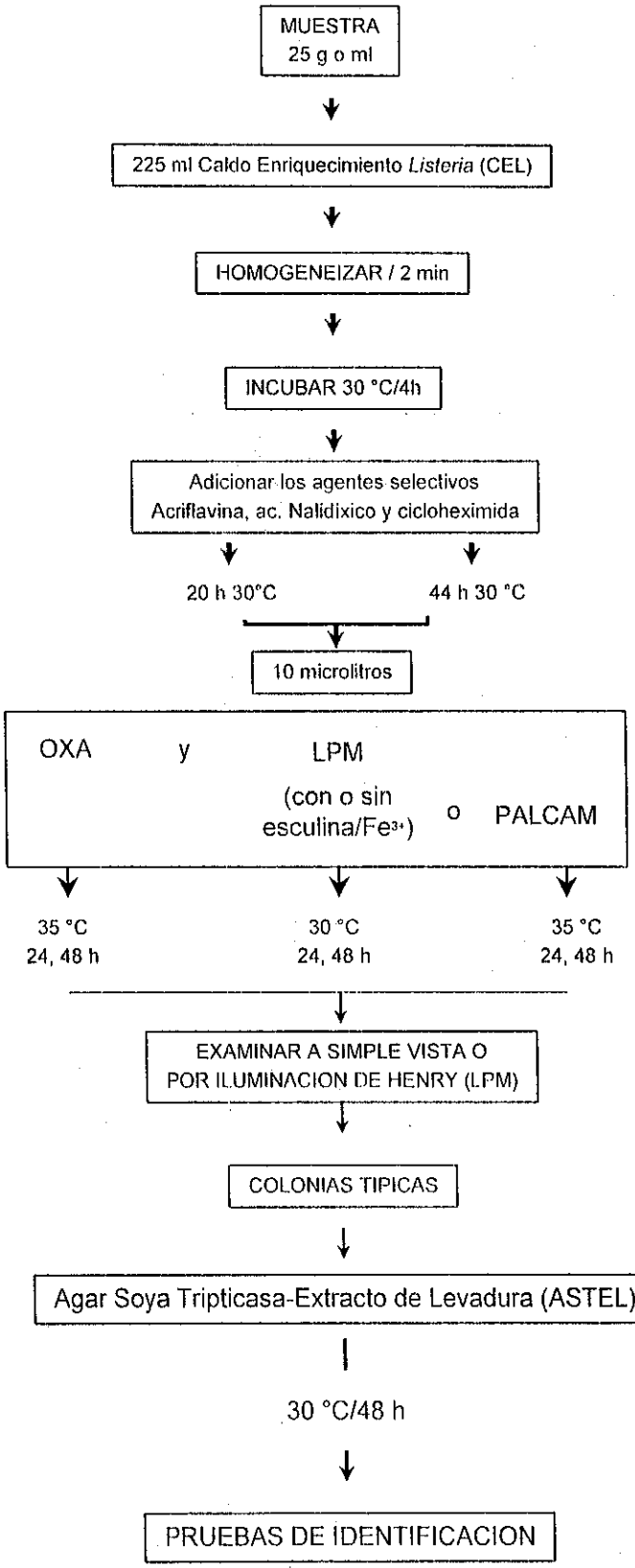


Figura 3. Procedimiento FDA para aislamiento de *L. monocytogenes* de alimentos (Donnely, 1999, Hitchins, 1995)

Cabe señalar que en este estudio los medios de aislamiento empleados fueron el LPM y el MOX (Medio de Oxford Modificado), el OXA se sustituyó por el MOX por ser éste último mas económico, de mas sencilla preparación y además mas selectivo que el LPM y OXA (Donnely, 1999). Además de las pruebas de identificación señaladas en el procedimiento FDA, en este estudio se incluyeron otras pruebas adicionales recomendas por otros autores (Lovett, 1989b).

A. ENRIQUECIMIENTO

Se transfieren 25 gr o ml de muestra a 225 ml de CEL, se homogeniza en licuadora o agitador de paletas (*Stomacher*) por 2 minutos y se incuba a 30 °C por dos días en un matraz o frasco de 500 ml con rosca o incluso en la misma bolsa en que se homogenizó. Se recomienda que la muestra sea homogenizada en el CEL sin inhibidores y se incube por 4 h a 30 °C en esa condición. Cumplido el tiempo, se añaden los agentes selectivos al CEL y se prolonga el tiempo de incubación 44 h más (Figura 3).

B. AISLAMIENTO.

A las 24 y 48 horas de incubación del CEL, se siembran por estria superficial 10 microlitros del cultivo en las placas (en este caso MOX y LPM) las cuales se incuban a 35 °C y 30 °C , respectivamente, por 48 h (Figura 3).

En LPM las colonias sospechosas a *Listeria*, a simple vista generalmente son translúcidas con apariencia de gota de rocío, pudiendo observarse incluso de color blanco. La selección se hace utilizando la técnica de transiluminación oblicua de Henry (Iluminación de Henry) que se ilustra en la figura 4. Mediante esta técnica, las colonias sospechosas se observan grises con aspecto de vidrio despulido y un brillo azulado típico o de color blanco. En MOX, las colonias sospechosas presentan 2-3 mm de diámetro, coloración gris-negra con un halo de precipitación café obscuro-negro (complejo fierro-fenólico de la esculina mas iónes férricos) y centro hundido. Se recomienda usar cultivos control, positivo y negativo a *L. monocytogenes* para facilitar su identificación. Cinco o más colonias típicas por placa, se pasan a placas de

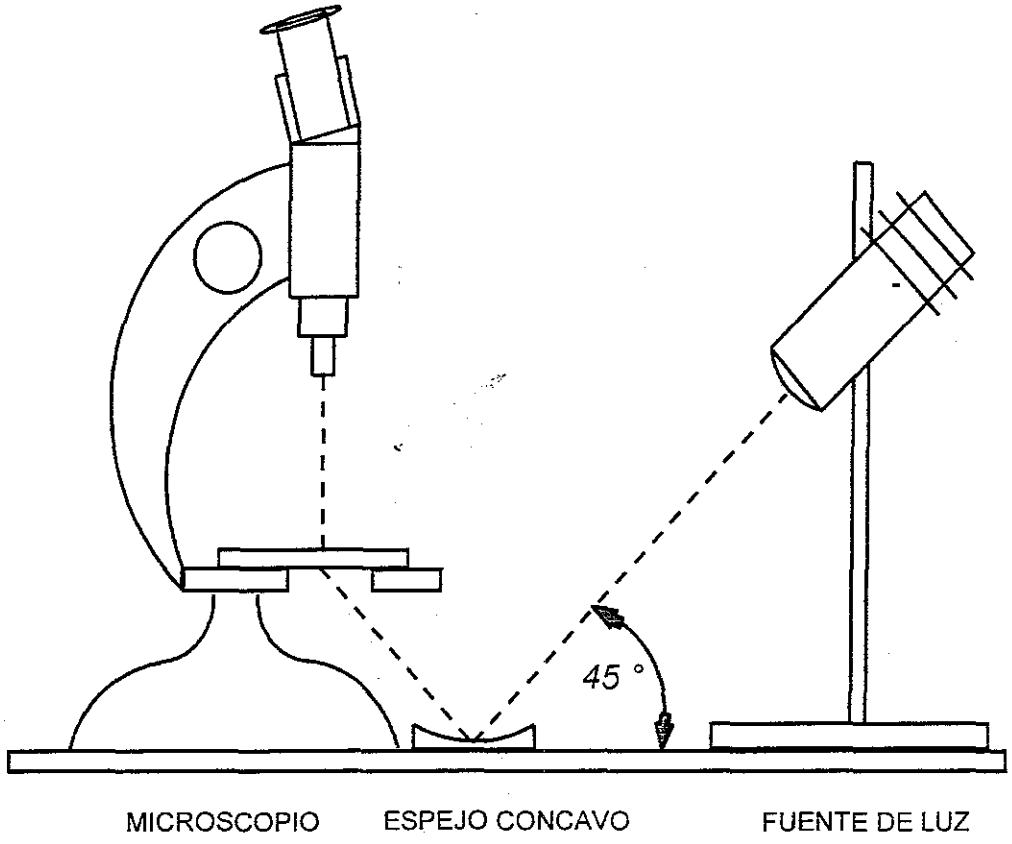


Figura 4. Iluminacion oblicua de Henry

Agar Soya Tripticaseína con Extracto de Levadura (ASTEL) para checar pureza. Las placas se incuban a 30 °C por 24-48 h o hasta observar un desarrollo satisfactorio.

C. IDENTIFICACIÓN.

A partir de ASTEL se realizan las pruebas de catalasa, gram, morfología microscópica, hemólisis y CAMP. Con una colonia típica en ASTEL se siembra un tubo con Caldo de Soya Tripticaseína con Extracto de Levadura (CSTEL), se incuba a 30 °C por 24 h. Este último se emplea como inóculo de las pruebas restantes (Figura 5). La mayoría de las pruebas se realizaron según los procedimientos recomendados por MacFaddin (1980), por lo que sólo se mencionarán aspectos específicos de algunas de las pruebas empleadas.

A partir del CSTEL incubado a 30 °C se realiza la prueba de movilidad en fresco, observándola de preferencia en un microscopio de contraste de fases, la prueba es positiva cuando el movimiento es en forma de tumbos o rotatorio.

En la determinación del **gram**, por razones prácticas, se utilizó la prueba de hidróxido de potasio (Baron y Finegold, 1990), que consiste en tomar una colonia con el asa y emulsionarla con agitación continua por 60 segundos sobre una gota de KOH al 3% colocada previamente sobre un portaobjetos. El cultivo es gram-negativo cuando al separar suavemente el asa del portaobjetos se observa la formación de un hilo viscoso, en caso contrario el cultivo es gram-positivo.

La **morfología microscópica** se determina mediante tinción simple con cristal violeta, y observación microscópica con objetivo de inmersión.

En la prueba de **hemólisis** se utiliza el medio en placa de ASTEL adicionado de sangre de ovino al 7% (ASTELSO). Se inocula por estría y picadura, y se incluyen controles positivos (*L. monocytogenes y L. ivanovii*) y control negativo (*L. innocua*), se incuba a 35 °C por 48 h.

La **prueba de CAMP** se realiza en ASTELSO y se emplea *Staphylococcus aureus* ß hemolítico y *Rhodococcus equi* que son sembrados

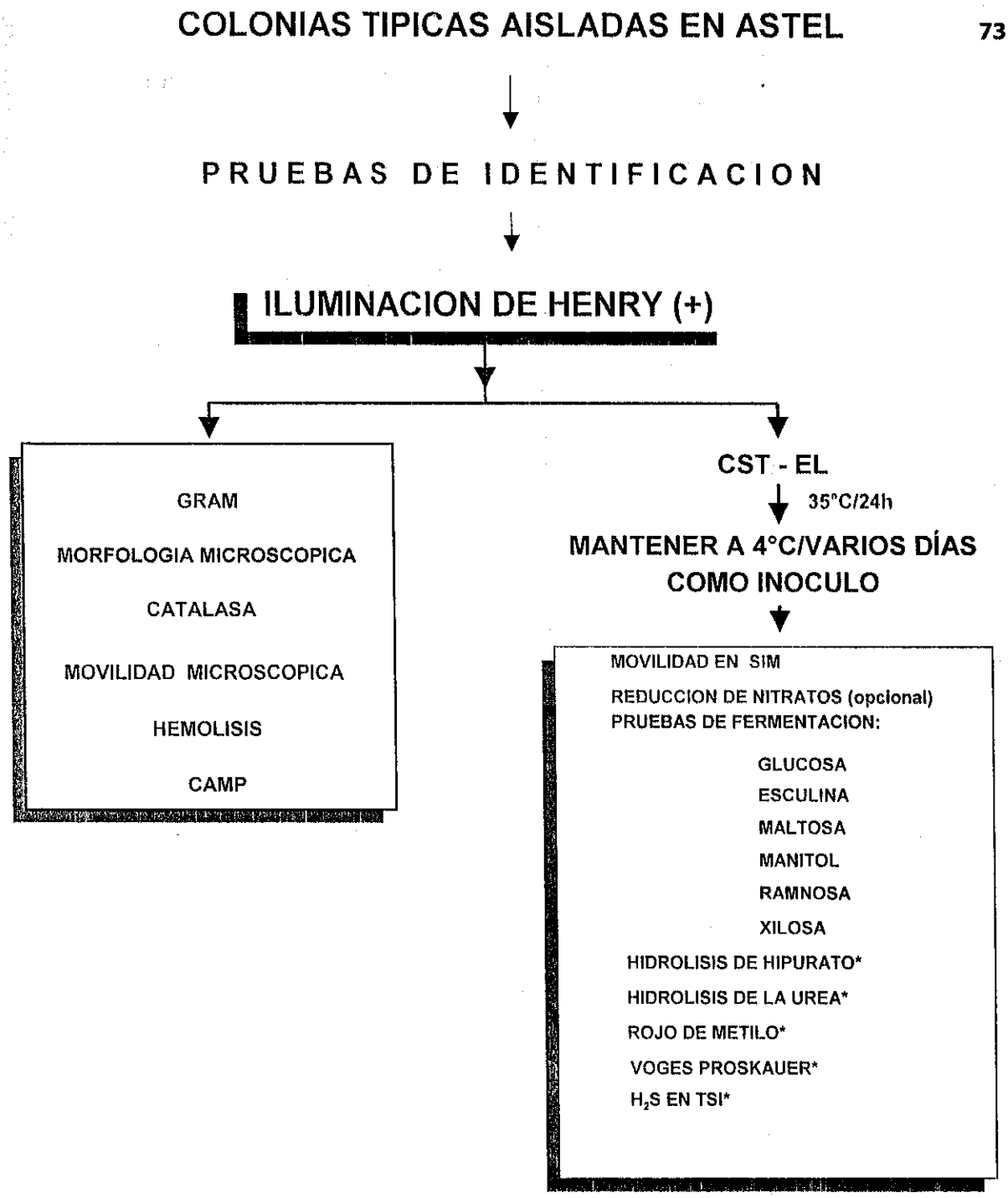


Figura 5. Identificación de *Listeria* (Hitchins, 1995; Lovett, 1989b)

sobre la placa en líneas paralelas separadas aproximadamente 5 cm uno del otro; las cepas sospechosas de *Listeria* se siembran en la parte media formando ángulos rectos, pero sin tocar las líneas de cultivos de *S. aureus y R. equi* (aproximadamente 5 mm de separación). Se incuban a 35 °C por 24-48 h. La hemólisis se observa aumentada en la proximidad de *S. aureus* con *L. monocytogenes* y *L. seeligeri* y en la cercanía con *R. equi, L. ivanovii* forma, en la zona de hemólisis, una especie de punta de flecha (Figura 6).

La prueba de **hidrólisis de urea** se realiza en medio de agar urea en tubo, pero por razones prácticas y económicas puede hacerse en placa. Se inocula por estría superficial y se incuba a 35 °C por 5 días, observandose diariamente.

La prueba de **reducción de nitratos a nitritos** se realiza en caldo nitrato, se incuba a 35 °C por 5 días y entonces se agregan los reactivos, en caso negativo se agrega zinc en polvo y se deja reposar una hora.

Movilidad en SIM. El medio se inocula por picadura a 5 mm de profundidad y se incuba por 7 días a 22 °C o a temperatura ambiente, observar diariamente para detectar la movilidad típica en sombrilla.

Rojo de Metilo-Voges Proskauer. Estas pruebas se realizan en tubos separados de caldo MR-VP para evitar escurrimientos del cultivo. El caldo MR-VP para la prueba de Voges Proskauer se incuba a 35 °C por 4 días, y el MRVP para Rojo de Metilo se incuba a 35 °C por 2 días, y entonces se agregan los reactivos.

H_2S en TSI. El TSI se incuba a 35 °C por 5 días y se observa si hay desarrollo y ennegrecimiento.

Hidrólisis de hipurato de sodio. Se transfieren 0.4 ml del medio de hipurato de sodio al 1% a un tubo estéril, con el asa se siembra una cantidad de inóculo suficiente para observar turbiedad y se incuba a 35 °C en baño María por 2 h. Se agregan 5 gotas de reactivo de Ninhidrina (no de agita) y se continúa incubando por 10 minutos más. La presencia de un color azul índigo indica una prueba positiva. Reportar inmediatamente.

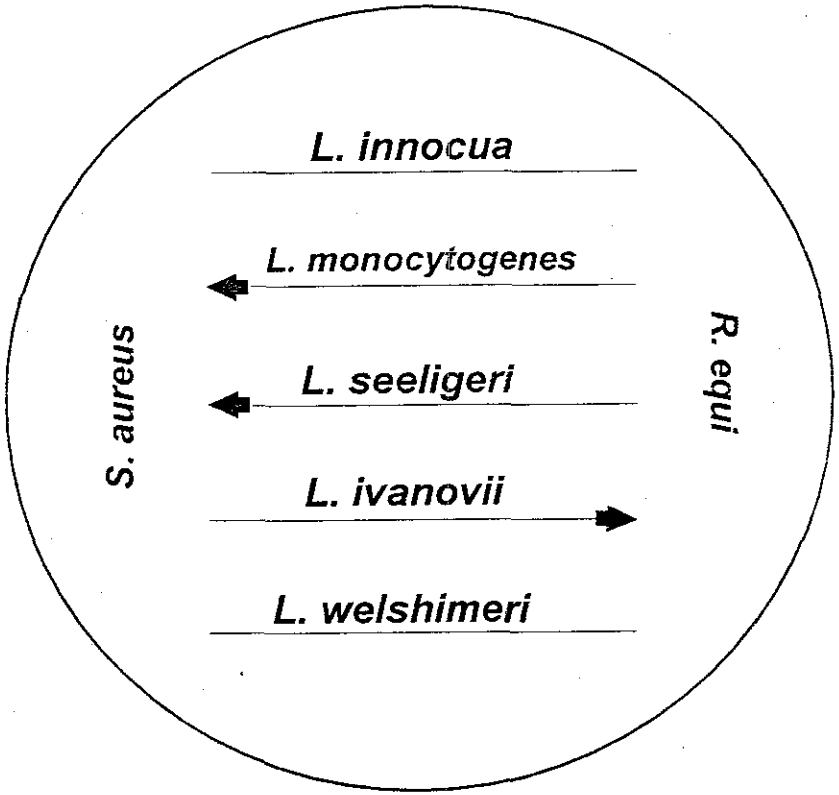


Figura 6. Prueba de CAMP

Fermentación de carbohidratos. Se emplea el medio de agar base púrpura de bromocresol adicionado del carbohidrato de prueba (0.5 %). Los tubos o placas ya inoculados se incuban a 35 °C por 7 días, observándose diariamente. La reacción es positiva cuando se observa que el medio vira de púrpura a amarillo.

Los resultados de las pruebas se comparan con el esquema de identificación de especies de *Listeria* (Cuadros 12 y 13).

ETAPA 2.- Nivel de contaminación por *Listeria* en el queso Adobera positivo a la presencia del patógeno.

Todas la muestras de queso que estaban en proceso de determinarse si contenían o no *Listeria*, se mantuvieron en refrigeración a 4 °C. A las muestras que resultaron positivas se les determinó el nivel de contaminación con el patógeno. Esta determinación se realizó dentro de la misma semana del muestreo del queso y se realizó mediante recuentos por la Técnica de Siembra Directa en Placa, en el medio de Oxford Modificado (Figura 7). Se utilizó 10 g de muestra (queso positivo) en 90 ml de diluyente de peptona al 0.1 % a 43 °C, se homogeneizó por dos minutos en un agitador de paletas (*Stomacher* 400 marca *Seward),* se hicieron dos diluciones subsecuentes y 0.1 ml de cada dilución se inoculó en medio de Oxford Modificado por duplicado y se sembró por superficie. Las placas se incubaron a 35 °C por 48 horas, y se procedió a contar todas las colonias típicas de *Listeria* que presentaron las siguientes características: colonias negras con un halo negro, algunas colonias presentan un tono café obscuro que se define bien a los siete días de incubación.

Una colonia por placa fue transferida a ASTEL inclinado e incubado a 35 °C por 24 horas y se almacenó a 4 °C para su confirmación. Las pruebas confirmatorias incluyeron: catalasa, movilidad típica en CSTEL, incubado a 21 °C por 24 horas y formación de colonias características cuando de observan bajo la iluminación de Henry.

Cuadro 12. Diferenciación de las especies de *Listeria*

Especie	Hemólisis (Beta)[a]	CAMP		Reducción de nitratos	Producción de ácido de:			Virulencia (ratón)
		S. aureus	*R. equi*		Manitol	Ramnosa	Xilosa	
L. monocytogenes	+	+	—	—	—	+	—	+
L. ivanovii	+	—	+	—	—	—	+	+
L. innocua	—	—	—	—	—	V[b]	—	—
L. welshimeri	—	—	—	—	—	V	+	—
L. seeligeri	+	+	—	—	—	—	+	—
L. grayi[c]	—	ND	ND	V	+	V	—	—

[a]: Picadura en agar sangre de ovino
[b]: variable
[c]: *L. grayi* incluye las cepas de *L. murrayi* reductoras de nitratos y ramnosa-variable.
ND: No determinado

Fuente: Hitchins, 1995

Cuadro 13. Diferenciación de especies de *Listeria* y organismos relacionados comúnmente referidos como *Listeria*

PRUEBAS BIOQUIMICAS	Listeria							
	monocytogenes	*ivannovi*	*innocua*	*welshimeri*	*seegeri*	*grayi*	*murrayi*	*denitrificans* [a]
Dextrosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnosa	+	-	V[b]	V	-	-	V	-
Xilosa	-	+	-	+	+	-	-	+
Manitol	-	-	-	-	-	+	+	-
Hidrólisis de Hipurato	+	+	+	+	+	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	-
Rojo de Metilo	+	+	+	+	+	+	+	+
Beta Hemólisis	+	+	-	-	+	-	-	-
Hidrólisis de Urea	-	-	-	-	-	-	-	-
Reducción de Nitratos	-	-	-	-	-	-	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2S en TSI	-	-	-	-	-	-	-	-
H_2S en tira de acetato de Pb	-	-	-	-	-	+	+	-
Camp (+) / S. aureus	+	-	-	-	+	-	-	-
camp (+) / R. Equi	-	+	-	-	-	-	-	-

[a] = Reclasificado como *Jonesia denitrificans* (103A)
V[b] = Variable

Fuente: Lovett, 1989 b

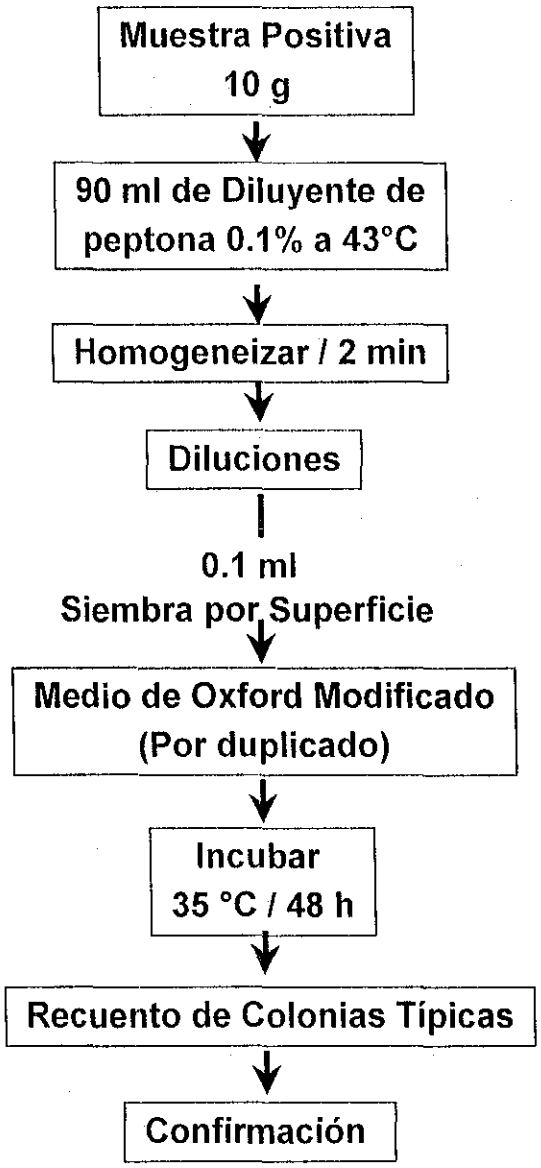


Figura 7. Recuento de *Listeria* por siembra directa en placa

ETAPA 3.- Comportamiento de una cepa nativa de *L. monocytogenes* y cambios concurrentes en la flora láctica, pH y acidez durante la fabricación y el almacenamiento de queso Adobera.

Materias primas.

a) Leche entera pasteurizada de vaca, marca "sello rojo" obtenida de los sitios de venta el mismo día del inicio del experimento.
b) Cuajo líquido, marca "Cuamex ", de Santa Anita, Jal.
c) Cloruro de calcio, J. T. Baker.
d) Sal de mesa, refinada y yodada, "La Fina", Mex.

Cultivos microbianos.

L. monocytogenes 1633 aislada de queso adobera de Guadalajara, Jalisco.

Cepas control:

Staphylococcus aureus beta hemolítico aislado de un caso de mastitis bovina.

L. monocytogenes California (CA) *, serotipo 4B, aislada de queso tipo Mexicano.

L. monocytogenes V7 *, serotipo 1, aislada de leche.

L. monocytogenes Scott A *, serotipo 4b, aislada de un caso clínico.

*L. seeligeri**

*L. ivanovii**

*L. innocua**

*Rhodococcus equi**

*Cepas proporcionadas por el Profesor Michael P. Doyle del Center for Food Safety and Quality Enhancement de la Universidad de Georgia, EUA.

Diseño del experimento.

Para determinar el comportamiento de *L. monocytogenes* durante la elaboración y el almacenamiento del queso adobera, se utilizaron quesos elaborados en el laboratorio de acuerdo al procedimiento recomendado por fabricantes de la región. En la elaboración del queso, se empleó leche

pasteurizada obtenida en el comercio. La leche se inoculó con la cepa nativa de *L. monocytogenes* 1633 (aislada de un queso Adobera de la región) y se utilizó un nivel de inóculo cercano a 2.5 $x10^4$ ufc/ml. Antes de inocular artificialmente la leche, se tomó una muestra para determinar la presencia de *Listeria* (técnica FDA) y otra para la detección de inhibidores (*Bacillus stearothermophylus* var *calidolactis*) que en caso de resultar positivas se invalidaría el experimento. Se realizaron 4 experimentos y en cada uno de ellos se incluyeron muestras por duplicado de las distintas etapas de la fabricación del queso (leche pasteurizada, leche inoculada, suero, cuajada al corte, acidificado en masa 3 h, 8 h, 12 h y 20 h, prensado 3 h, 8 h y 20 h), así como del producto terminado durante su almacenamiento en refrigeración (4 °C) por 22 días (Adobera a los 0, 8, 15 y 22 días respectivamente). Todas las muestras se sometieron a las siguientes determinaciones: recuento de *L. monocytogenes*, recuento de bacterias lácticas, pH y acidez (Figura 8).

En el queso Adobera, las muestras se obtuvieron por corte de rebanadas tipo pastel, con el fin de obtener muestra de los extremos así como del interior del queso.

Elaboración del queso Adobera.

En cada experimento se utilizaron aproximadamente 16 litros de leche y se fabricaron 2 Adoberas de aproximadamente 0.8 a 1 kg c/u, una se empleó en las determinaciones durante su fabricación, y la otra durante la refrigeración por 22 días a 4 °C.

El queso Adobera se elaboró de acuerdo al procedimiento recomendado por los productores de la región y consistió en: calentar la leche a 40 °C, adicionar y mezclar 0.3 g de cloruro de calcio por litro de leche y 0.2 ml de cuajo comercial disueltos previamente en 20 ml de agua destilada, dejar reposar 1 hora, cortar la cuajada suavemente haciendo un cuadriculado de aproximadamente 1 cm^2, reposar para asentar el grano 5 minutos, trabajo del grano (agitado ligero) 5 min, desuerado (retiro del suero sobrenadante),

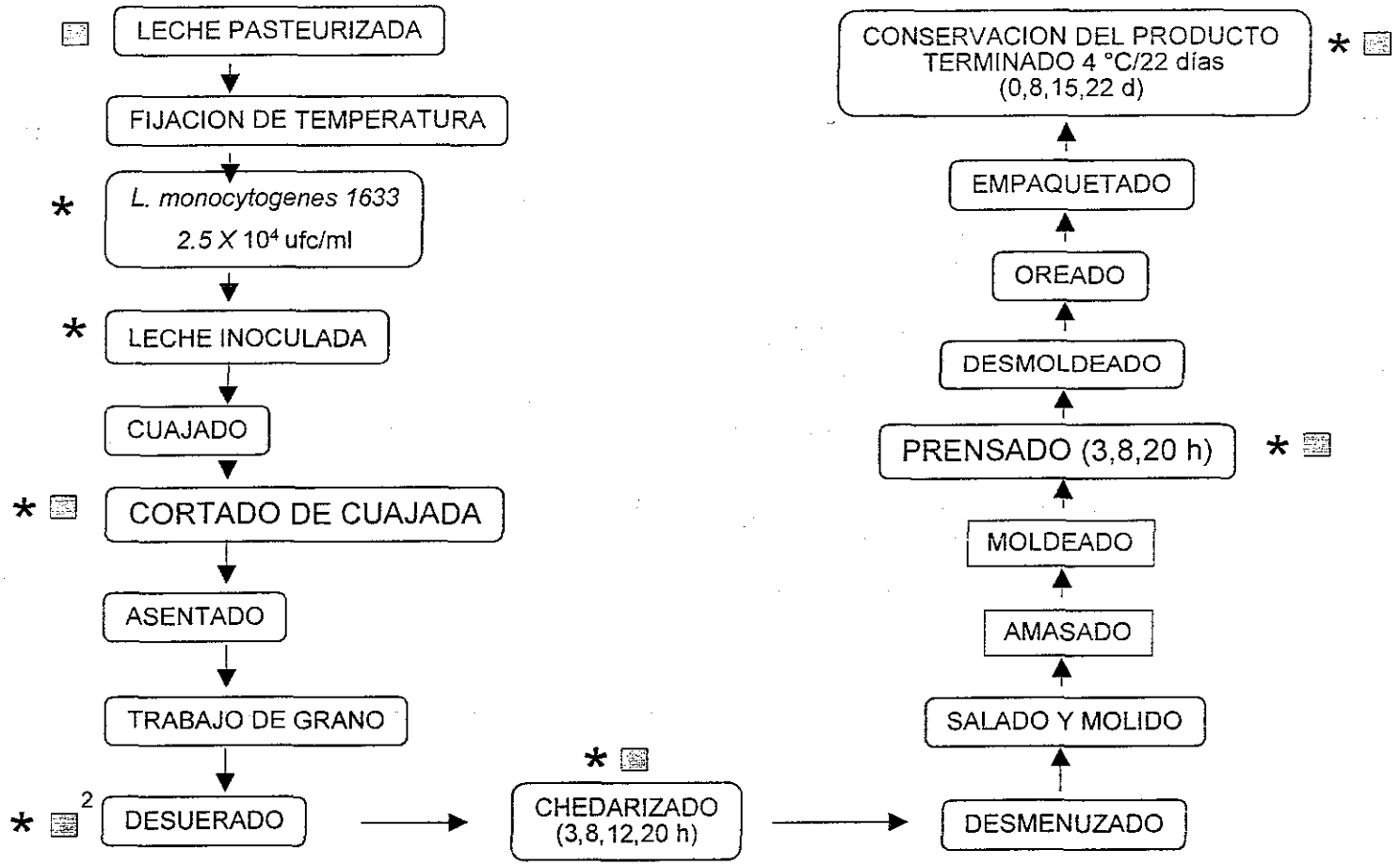


Figura 8. Determinaciones[1] durante la fabricación y almacenamiento del queso adobera

1 = Determinaciones por duplicado de 4 experimentos, 2 = No recuento de lácticos, ▤ = Recuento de lácticos, Acidez y pH., * = Recuento de *L. monocytogenes*

bolseado (para desuerar), chedarizado, molido, salado, prensado, desmoldeado, oreado y empaquetado (Cuadro 14).

Preparación y adición del inóculo.

La preparación del inóculo se realizó de acuerdo al procedimiento señalado por Buazzi *et al.* (1992), y se describe en la figura 9, se realizaron los cálculos pertinentes con el fin de obtener $2.5x10^4$ ufc/ml de leche inoculada.

Adición del inóculo: El volumen del inóculo previamente homogenizado en vortex por aproximadamente 1 minuto, se transfirió con un pipeteador automático a un matraz con 500 ml de leche pasteurizada y a 40 °C, se mezcló por agitación y se adicionó lentamente al resto de los 16,000 ml de leche.

Recuentos microbianos.

Todas las muestras se procesaron por duplicado. Las muestras (25 g o ml) de leche pasteurizada, leche inoculada y suero a diluciones adecuadas en diluyente de peptona al 0.1 % (225 ml se usaron en la primera dilución y 10 ml en las subsecuentes) previamente mantenido en baño María a 43 °C, fueron sembradas directamente, mientras que las muestras de cuajada y queso previamente se homogenizaron en *Stomacher* con el diluyente durante dos minutos.

Una misma dilución en cada muestra se utilizó para realizar los diferentes recuentos.

a) Recuento de *L. monocytogenes.*

Se empleó la técnica de Siembra Directa en Placa (Fernández, 1981). El medio de aislamiento fue el agar Vogel Johnson modificado (VJM) (Buchanan *et al.,* 1987), adicionado de telurito de potasio, moxalactam, ácido nalidíxico y bacitracina, que a su vez fue modificado en nuestro estudio con el propósito de ajustarlo en lo referente a la concentración de inhibidores, tal como lo recomiendan algunos autores (Buchanan *et al.,* 1987). Finalmente el medio se empleó con una reducción al 50 % en la concentración de los últimos 3 inhibi-

Cuadro 14. Programa de elaboración del queso adobera

ETAPA	TIEMPO	TEMPERATURA AMBIENTAL
	Primer día	
Compra de leche pasteurizada	07:30 a.m.	10°C
Recepción de leche en el Lab.	08:15 a.m.	18°C
Calentar la leche a 40°C	12:30 p.m.	20°C
Adición de *L. monocytogenes*	01:00 p.m.	20°C
Adición de cloruro de calcio	01:05 p.m.	21°C
Adición de cuajo	01:10 p.m.	21°C
Corte de cuajada	02:00 p.m.	22°C
Asentado	02:10 p.m.	23°C
Trabajo de grano	02:20 p.m.	23°C
Desuerado	02:30 p.m.	25°C
Bolseado	03:00 p.m.	27°C
Acidificado (4° C)	03:30 p.m.	28°C
	Segundo día	
Molido (desmenuzado)	11:30 a.m.	18°C
Salado	12:00 p.m.	19°C
Moldeado	12:30 p.m.	20°C
Prensado	01:00 p.m.	21°C
	Tercer día	
Desmoldeado y oreado	09:00 a.m.	18°C
Envoltura	01:00 p.m.	21°C
Refrigeración del producto terminado	01:15 p.m.	22°C

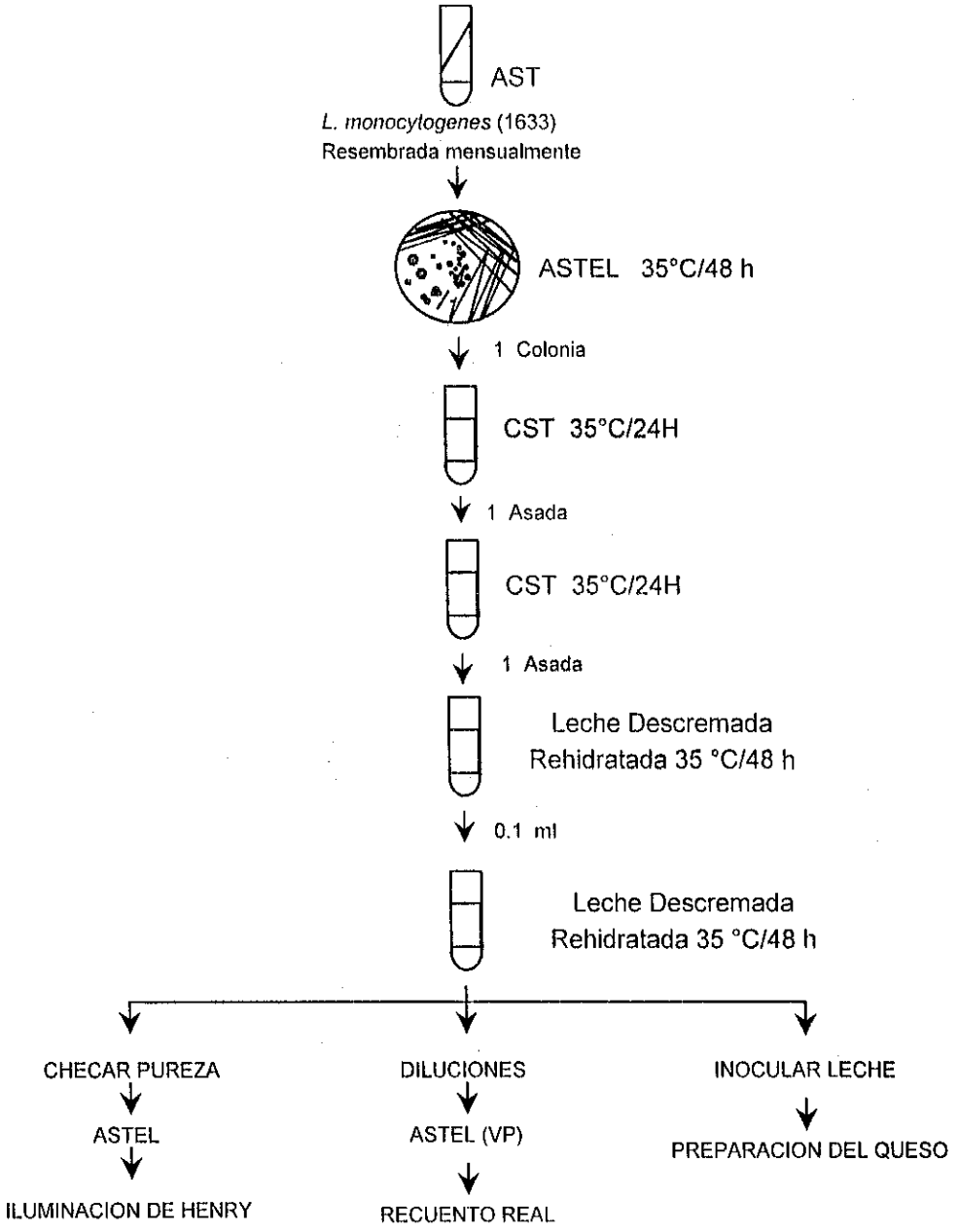


Figura 9. Preparación del inoculo

dores además de la adición de tween 80 al 0.4 % según lo propone Smith y Buchanan (1990). Las placas se incubaron a 30 °C por 48 horas, y se procedió a contar todas las colonias típicas de *Listeria* que presentaron las siguientes características: completamente negras (telurito positivas), sobre un fondo rojo (manitol negativas), brillantes, convexas, de 2 a 5 mm de diámetro. Una colonia por muestra de la placa con la más alta dilución fue transferida a ASTEL inclinado e incubado a 35 °C por 24 horas y se almacenó a 4 °C para su confirmación. Las pruebas confirmatorias incluyeron: catalasa, movilidad típica en CSTEL, incubado por 24 h a 21 °C y formación de colonias características cuando se observan bajo la iluminación de Henry (Figura 10).

b) Recuento de bacterias lácticas.

Se utilizó la técnica de Siembra Directa en placa (Fernández, 1981). 0.1 ml de cada dilución se inoculó por superficie en Agar Actidiona Polimixina Nitrato (APN) (Davidson y Cronin, 1973), las placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas. Ya que según los autores del medio APN, en los productos lácteos por lo menos, más del 98 % de las colonias en este medio pertenecen a bacterias lácticas, se procedió a contar y reportar como tales.

Determinación de pH y acidez titulable.

pH.

Se utilizó un potenciómetro digital marca Ingold modelo 9023004. La medición se realizó por duplicado de muestra en 20 g o ml. En la homogenización de las muestras sólidas se empleó agua destilada recién ebullida y a temperatura ambiente.

Acidez.

La acidez expresada en porciento de ácido láctico se determinó según Bradley *et al.* (1992), mediante titulación en muestras por duplicado de 18 g cada una adicionadas de 36 ml de agua destilada, hervida y enfriada. Como solución indicadora se adicionó 0.5 ml de fenolftaleína y se tituló con hidróxido de sodio al 0.1 N, hasta que el primer color permanente cambie a rosa 30 segundos. Se registró el volumen de solución tituladora gastado.

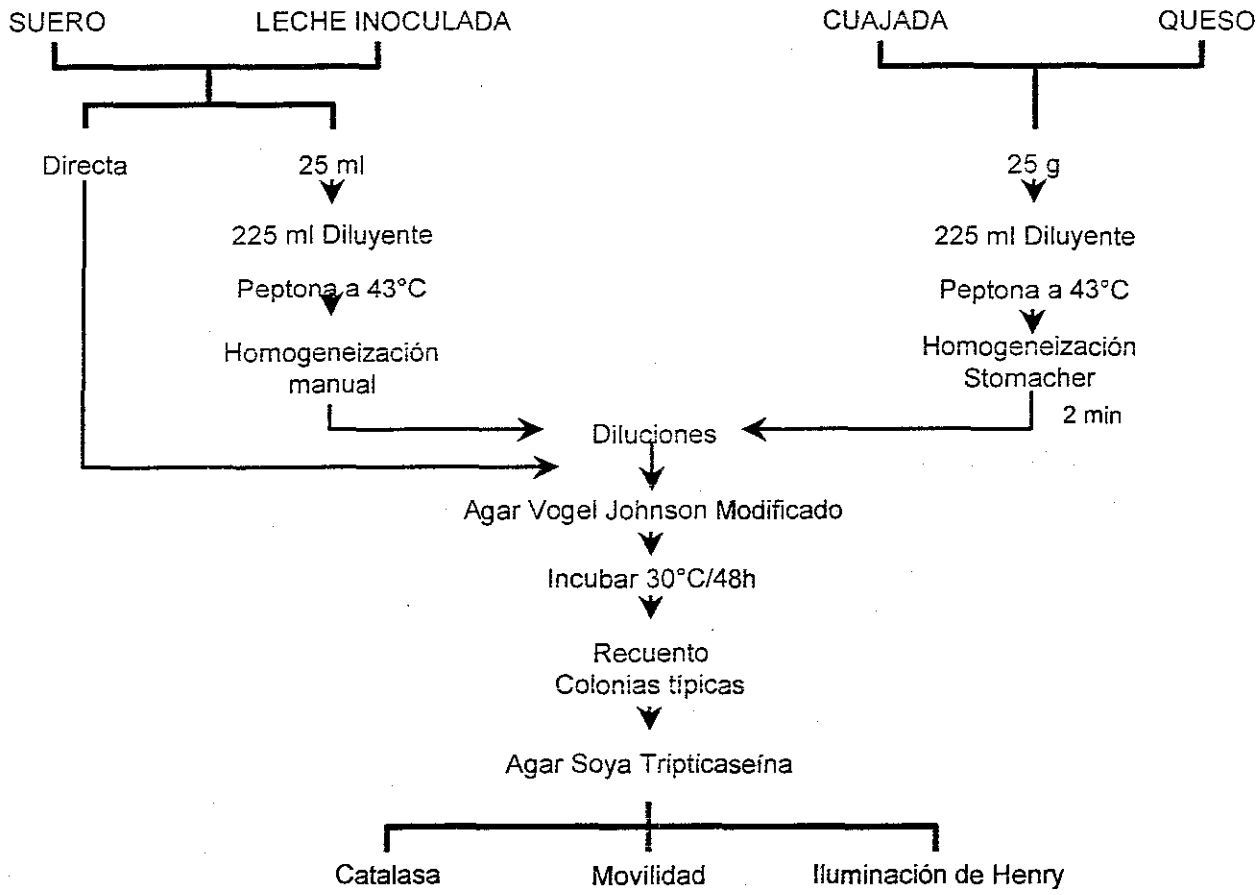


Figura 10. Recuento de *Listeria monocytogenes* por siembra directa en placa

En la obtención de datos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ac. láctico} = \frac{\text{ml gastados NaOH X N(NaOH) X MEQ ac. láctico}}{\text{gr de muestra}} \times 100$$

Una vez obtenido el resultado se procedió a sacar el promedio del duplicado.

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

Además de las prácticas estándar recomendadas para un laboratorio de microbiología, se tomaron algunas medidas adicionales de seguridad con el fin de proteger, hasta donde fue posible, al personal participante. Tales medidas fueron:

Empleo de un incinerador eléctrico para la esterilización de las asas bacteriológicas.

Uso de pipeteador automático o perilla, evitando el riesgo de ingestión del patógeno o de substancias tóxicas como la acriflavina y la cicloheximida.

Empleo del equipo Stomacher en la homogeneización de las muestras.

Empleo de cubrebocas durante el manejo de cultivos.

Empleo de lentes de protección cuando se manejaron cultivos en caldo o lácteos líquidos contaminados.

Uso de solución de iodóforo al 5 % en la desinfección de superficies y materiales contaminados lábiles al calor.

PROCESAMIENTO DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

ETAPA 1.

Frecuencias de muestras y marcas positivas y negativas: Porcentajes, Intervalos de Confianza ($p<0.05$).

Eficacia de medios de aislamiento y tiempos de incubación: porcentajes de positividad y de falsos negativos, Intervalos de Confianza ($p<0.05$).

Rangos de pH en muestras estudiadas y positivas: valores límite, porcentajes y desviación estándar.

ETAPA 2.

Niveles de contaminación de quesos positivos: porcentaje de frecuencias por niveles, promedio, mediana y límite superior.

ETAPA 3.

Comportamiento de *L. monocytogenes* y cambios concurrentes en la flora láctica pH y acidez.

Se obtuvieron los promedios y las desviaciones estandar de las 4 variables (*Listeria*, lácticos, pH y acidez).

Se determinó la correlación entre las cuatro variables, por cada etapa y tiempos, aplicando la prueba de Correlación lineal (r) de Pearson y se analizó con el programa estadístico: Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) Versión 7.0 para Windows, SPSS Inc.

6. RESULTADOS

6. RESULTADOS

Etapa 1.- Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso fresco Adobera elaborado con leche pasteurizada que se expende en tiendas de autoservicio.

De las 106 muestras estudiadas se encontró que 41 (38.6 %) resultaron positivas a *Listeria* (Figura 11), y de éstas, 17 (16 %) correspondieron a *L. monocytogenes*, en tanto que en 30 muestras se aislaron otras especies de *Listeria* (Figura 12).

L. innocua se encontró en 27 (25.4 %) de las muestras, por lo que fue la especie principalmente recuperada, seguida por *L. monocytogenes* en 17 (16 %) muestras, además se aisló, *L. welshimeri, L. seeligeri* y *L. grayi,* en 5 (4.7 %), 4 (3.7 %) y 1 (0.9 %) de las muestras, respectivamente (Figura 13).

La distribución de los aislamientos de *Listeria* (Figura 14) revela que en 30 de las muestras se obtuvieron aislamientos únicos, mientras que los aislamientos combinados se presentaron en solo 11 casos, *L. monocytogenes* se obtuvo como aislamiento único en 11 muestras, en las otras 6 se obtuvo en combinación con otras especies de *Listeria.*

La frecuencia de *Listeria* según distribución de las marcas del queso Adobera en los sitios de muestreo se presenta en el cuadro 15, resaltando el 100 % de marcas positivas para la categoría de alta distribución y la mayor frecuencia de muestras positivas 19 (45.2 %) en las marcas de mediana distribución.

De las 24 marcas de queso estudiadas, 15 (62.5 %) marcas resultaron positivas a *Listeria* y 10 (41.6 %) a *L. monocytogenes* (Cuadro 16). La positividad por marca así como el porcentaje y el intervalo de confianza (IC), para *Listeria* y *L. monocytogenes*, se presenta también en el cuadro 16.

Treinta y seis (87.8 %) de los aislamientos se detectaron por el agar LPM en tanto que sólo 26 (63.4 %) se obtuvieron por el medio MOX (Cuadro 17). La eficacia de los tiempos de incubación del CEL también se observa en el cuadro 17.

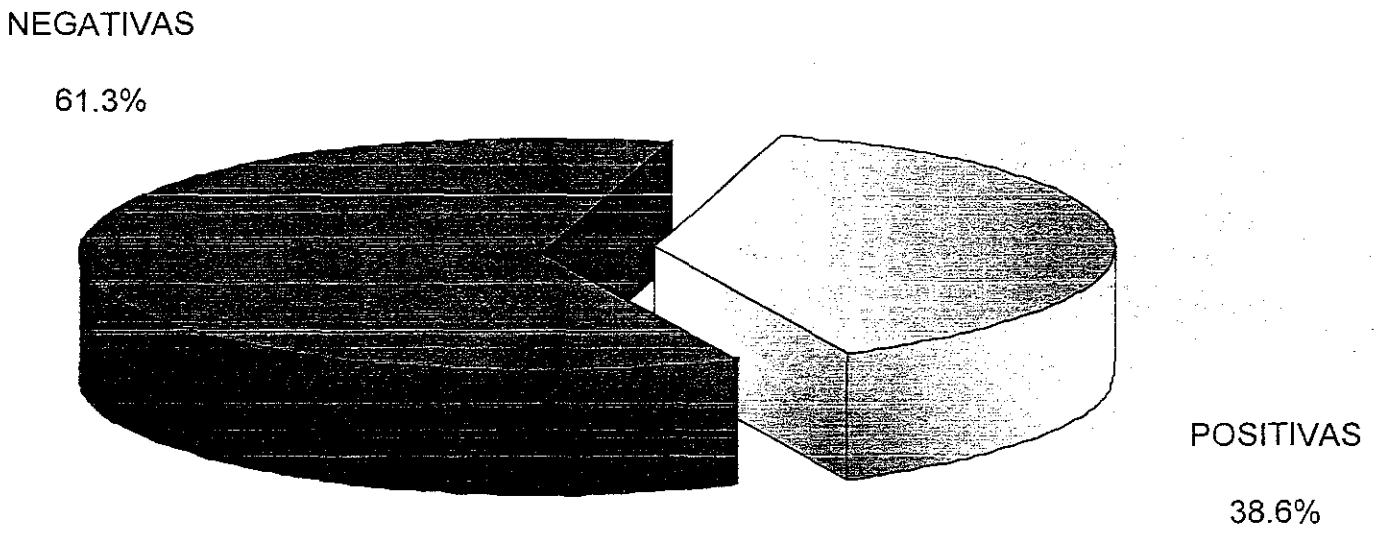


Figura 11. Frecuencia de *Listeria* en queso fresco adobera que se expende en tiendas de autoservicio de la zona metropolitana de Guadalajara. Procedimiento FDA (N=106)

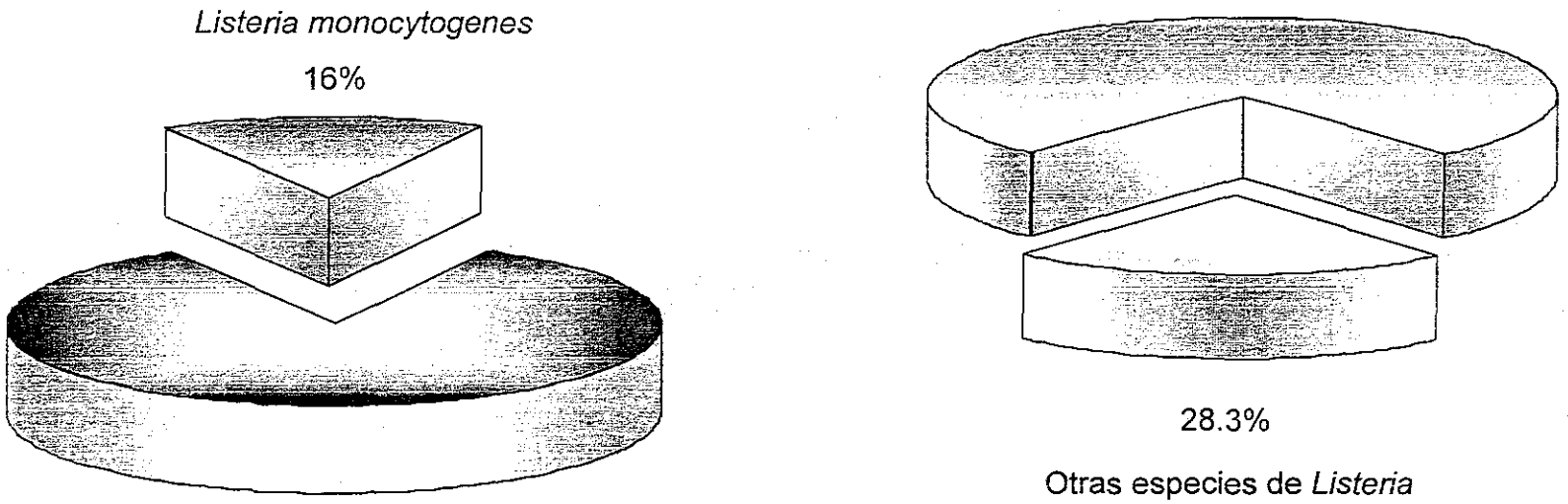


Figura 12. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso adobera que se expende en tiendas de autoservicio de la zona metropolitana de Guadalajara. Procedimiento FDA. (N=106)

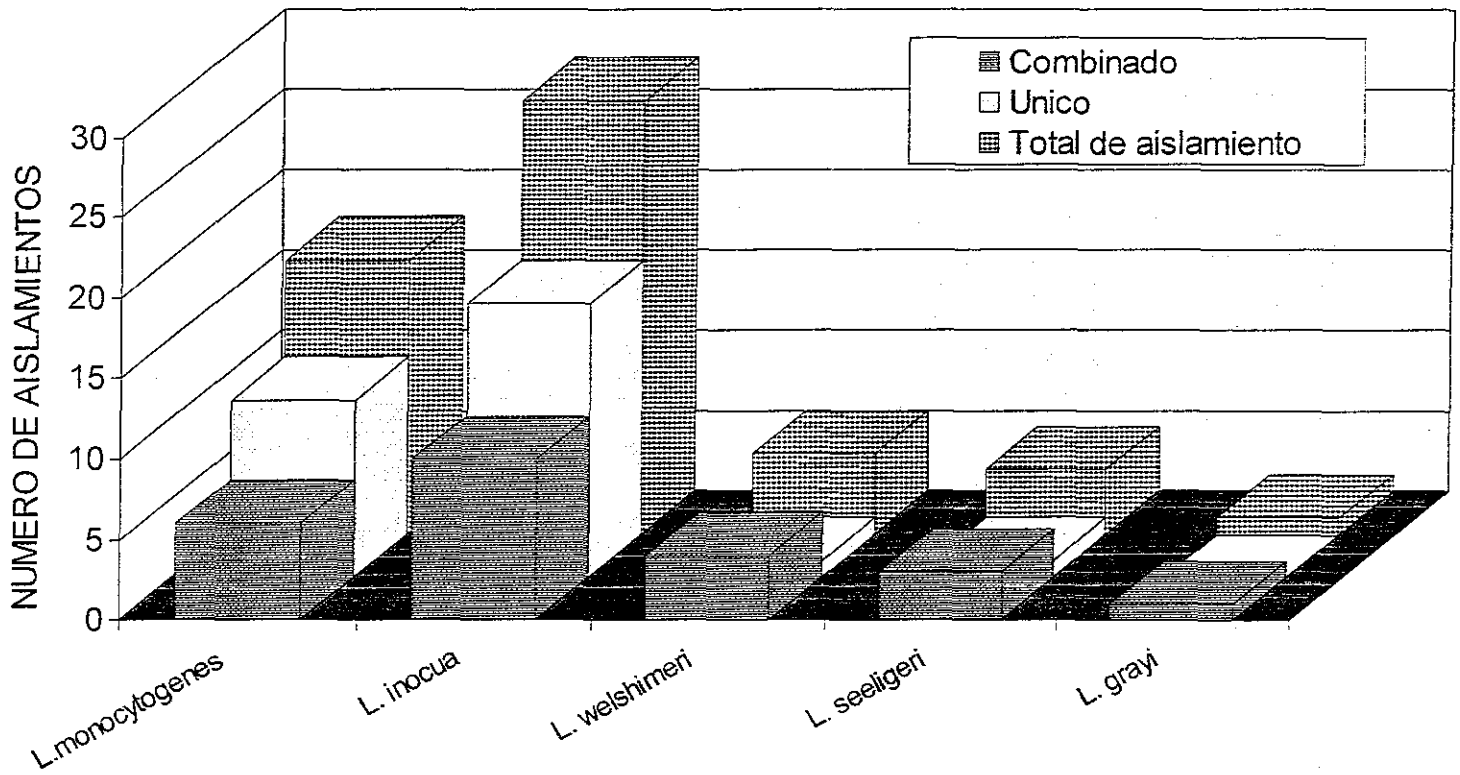
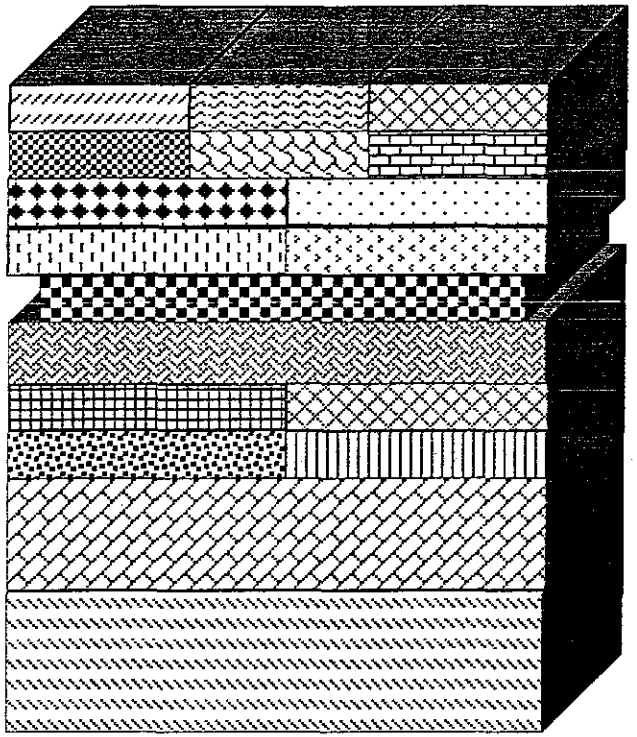


Figura 13. Frecuencia de especies de *Listeria* aisladas de queso adobera que se expende en tiendas de autoservicio de la zona metropolitana de Guadalajara (N=106)



L. monocytogenes + L. innocua + L. welshimeri	*1*
L. grayi + L. welshimeri + L. innocua	*1*
L. innocua + L welshimeri	*1*
L. seeligeri + L. welshimeri	*1*
L. seeligeri	*1*
L. welshimeri	*1*
L. seeligeri + L. innocua	*2*
L. monocytogenes + L. innocua	*5*
L. monocytogenes	*11*
L. innocua	*17*
TOTAL	41

Figura 14. Distribución de aislamientos de *Listeria* únicos o combinados a partir de queso adobera que se expende en tiendas de autoservicio de la zona metropolitana de Guadalajara (N= 106)

Cuadro 15. Frecuencia de *Listeria* en queso adobera según distribución de marcas en sitios de muestreo

CATEGORIAS POR MARCAS	No. DE MARCAS ESTUDIADAS / POSITIVAS (%)	No. DE MUESTRAS ESTUDIADAS POR MARCA	TOTAL ESTUDIADAS / POSITIVAS (%)
ALTA DISTRIBUCION	3/3 (100)	9-11	30/13 (43.9)
MEDIA DISTRIBUCION	8/5 (62.5)	4-6	42/19 (45.2)
BAJA DISTRIBUCION	13/7 (53.8)	1-3	34/9 (26.4)
TOTAL	24/15 (62.5%)		106/41 (38.6)

Cuadro 16. Positividad a *Listeria* por marcas de queso adobera que se expenden en tiendas de autoservicio de la ZMG
(N=24)

MARCAS POSITIVAS A *Listeria*	MUESTRAS ESTUDIADAS POR MARCA	MUESTRAS POSITIVAS (%) A *Listeria* (IC)*	MUESTRAS POSITIVAS A *L. monocytogenes* (%)(IC)
1	11	5 (45.4) (± 9.47)	1 (9.0) (±1.55)
2	10	7 (70) (± 3.99)	5 (50) (± 4.75)
3	9	1 (11.1) (± 1.87)	0
4	6	4 (66.6) (± 4.23)	0
5	6	5 (83.3) (± 2.64)	1 (16.6) (± 2.63)
7	5	2(40) (± 4.56)	2 (40) (± 4.56)
9	5	4 (80) (± 3.04)	1 (20) (± 3.04)
10	5	4 (80) (± 4.22)	3 (60) (± 4.22)
12	3	2 (66.6) (± 4.23)	1 (33.3) (± 4.22)
15	3	1 (33.3) (± 4.22)	0
16	3	1 (33.3) (± 4.22)	0
18	3	2 (66.6) (± 4.23)	1 (33.3) (±4.22)
19	3	1 (33.3) (± 4.22)	1 (33.3) (± 4.22)
20	3	1 (33.3) (± 4.22)	0
22	2	1 (50) (± 4.75)	1 (50) (± 4.75)
total=15 marcas =62.5%		Total	10 marcas =41.6%

* = Intervalos de Confianza (p<0.05)

Cuadro 17. Eficacia de los medios de aislamiento y del tiempo de incubación del caldo de enriquecimiento en la recuperación de *Listeria* queso fresco tipo adobera (N = 106)

MEDIO DE AISLAMIENTO	MUESTRAS POSITIVAS	No. (%) DE AISLAMIENTOS POR TIEMPO DE INCUBACION (h)			No. DE FALSOS NEGATIVOS (%) (IC)*
		24 + 48 -	24 - 48 +	24 + 48 +	
LPM	36	5	15	16	5 (12.1) (± 6.2)
MOX	26	8	11	7	15 (36.5) (± 9.16)

LPM= AGAR FENILETANOL-CLORURO DE LITIO-MOXALACTAM

MOX = MEDIO DE OXFORD MODIFICADO

* = Intervalo de confianza ($p < 0.05$)

Los pHs registrados para los quesos estudiados estuvieron entre 4.32 y 6.62, mientras que las muestras positivas presentaron pH mínimo de 4.41 y un máximo de 6.23 (Figura 15).

ETAPA 2.- Nivel de contaminación por *Listeria* en queso adobera positivo a la presencia de *Listeria*.

Los niveles de contaminación con *Listeria* encontrados en los quesos estudiados con este fin, oscilaron entre <100 y 3.7×10^5 ufc/g con una mediana de 200 ufc/g y un promedio de 1.8×10^4 ufc/g (Cuadro 18).

ETAPA 3.- Comportamiento de una cepa nativa de *Listeria monocytogenes* y cambios concurrentes en la flora láctica, pH y acidez durante la elaboración y almacenamiento del queso Adobera.

Los cuatro lotes de leche pasteurizada, muestreados antes de ser inoculados con el patógeno, resultaron negativos a *Listeria* (técnica FDA) y a la prueba de inhibidores (ensayo en disco con *Bacillus stearothermophylus* variedad *calidolactis*). Asimismo, el cuajo resultó libre de *Listeria sp.* (técnica FDA). El recuento real del inóculo utilizado en los cuatro experimentos fue de 4.30, 4.17, 4.46 y 4.42 log de ufc/ml respectivamente, con un promedio de 4.33 log de ufc/ml.

Los recuentos promedio y la desviación estandar (DE) de *L. monocytogenes* 1633, bacterias lácticas, así como el pH y la acidez durante la elaboración y el almacenamiento (4 °C) de 4 experimentos de queso Adobera, se presentan en el cuadro 19.

Las tendencias en el comportamiento de *L. monocytogenes* 1633 en los cuatro experimentos durante la fabricación se presentan en la figura 16, mientras que el promedio y la desviación estándar se muestran en la figura 17. El promedio de recuperación de la cepa en la leche recién inoculada fue de 4.5 log (DE $\pm$ 0.08). *L. monocytogenes* fue escasamente atrapada en la cuajada con una población promedio de 0.1 (DE $\pm$ 0.129) log de ufc/g mayor que la detectada en la leche recién inoculada. En el suero, la cepa disminuyó en promedio 1.6 (DE $\pm$ 0.52) log de ufc/ml en relación a la cuajada.

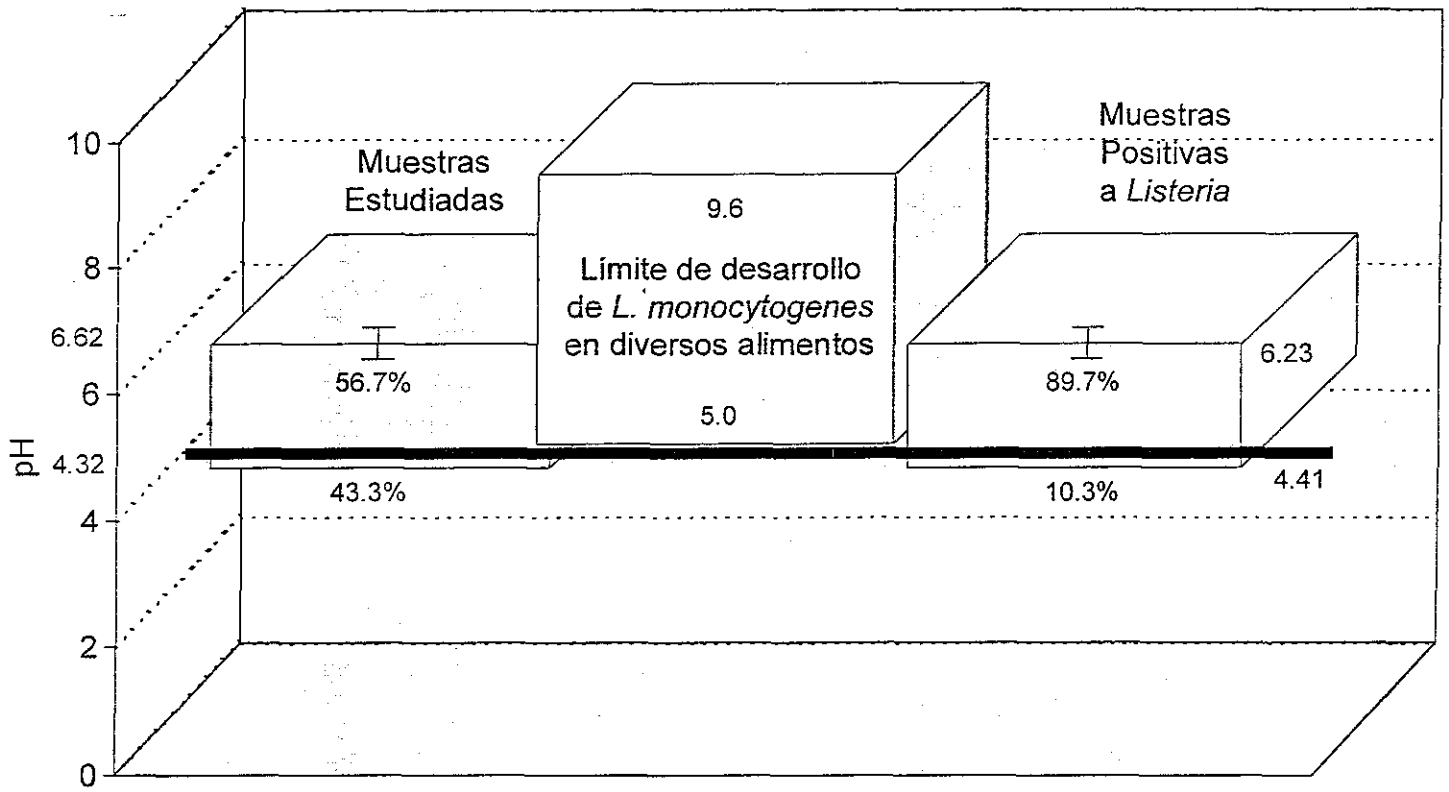


Figura 15. Rangos de pH y Desviación Estándar (I) en muestras de queso adobera de tiendas de autoservicio de la zona metropolitana de Guadalajara estudiadas y positivas a *Listeria* (N = 106)

Cuadro 18. Niveles de contaminación con *Listeria* y su frecuencia en queso pasteurizado tipo adobera

NIVELES DE ufc/g	FRECUENCIA	%
<100	3	10.7
101-1000	18	64.3
1001-10 000	5	17.8
10 001 - 100 000	1	3.6
100 001 - 1 000 000	1	3.6
TOTAL	28	100

$\bar{X}$ = 1.8 X 10^4 ufc/g md = 200 ufc/g Límite superior = 3.7 x 10^5 ufc/g

CUADRO 19. *Listeria monocytogenes*, LACTICOS, pH Y ACIDEZ EN QUESO ADOBERA

MUESTRA	*L. monocytogenes* [1] Log (DE)[2]	LACTICOS Log (DE)[2]	pH (DE)	acidez % Ac. láctico (DE)
Leche pasteurizada	ND[3]	3.0 (±0.813)	6.64 (±0.022)	0.1478 (±0.005)
Leche inoculada	4.5 (±0.080)[4]	ND	ND	ND
Cuajada al corte	4.6 (±0.129)	5.3 (±0.95)	6.60 (±0.019)	0.0905 (±0.004)
Suero	2.9 (±0.522)	ND	6.46 (±0.066)	0.0919 (±0.005)
Cuajada en acidificación 3 h	5.6 (±0.150)	5.8 (±0.129)	6.45 (±0.205)	0.1238 (±0.002)
Cuajada en acidificación 8 h	5.7 (±0.125)	5.8 (±0.238)	6.44 (±0.219)	0.1385 (±0.026)
Cuajada en acidificación 12 h	5.8 (±0.220)	5.8 (±0.095)	6.31 (±0.159)	0.1784 (±0.013)
Cuajada en acidificación 20 h	5.8 (±0.173)	5.9 (±0.095)	6.50 (±0.426)	0.1958 (±0.026)
Cuajada en prensado 3 h	6.2 (±0.191)	6.3 (±0.115)	6.22 (±0.422)	0.2687 (±0.064)
Cuajada en prensado 8 h	6.8 (±0.408)	6.8 (±0.262)	5.94 (±0.393)	0.3053 (±0.041)
Cuajada en prensado 20 h	7.6 (±0.081)	7.6 (±0.129)	5.79 (±0.511)	0.4663 (±0.178)
Adobera a 4° 8d	7.6 (±0.221)	8.4 (±0.330)	5.40 (±0.700)	0.6409 (±0.213)
Adobera a 4° 15d	8.2 (±0.355)	8.6 (±0.369)	5.21 (±0.437)	0.8293 (±0.248)
Adobera a 4° 22d	8.0 (±0.100)	8.5 (±0.100)	5.21 (±0.160)	0.7181 (±0.056)

[1] *L. monocytogenes* 1633 inoculada aproximadamente 25,000 ufc/ml de leche

[2] Desviación estándar

[3] No determinado

[4] Promedio de 4 experimentos

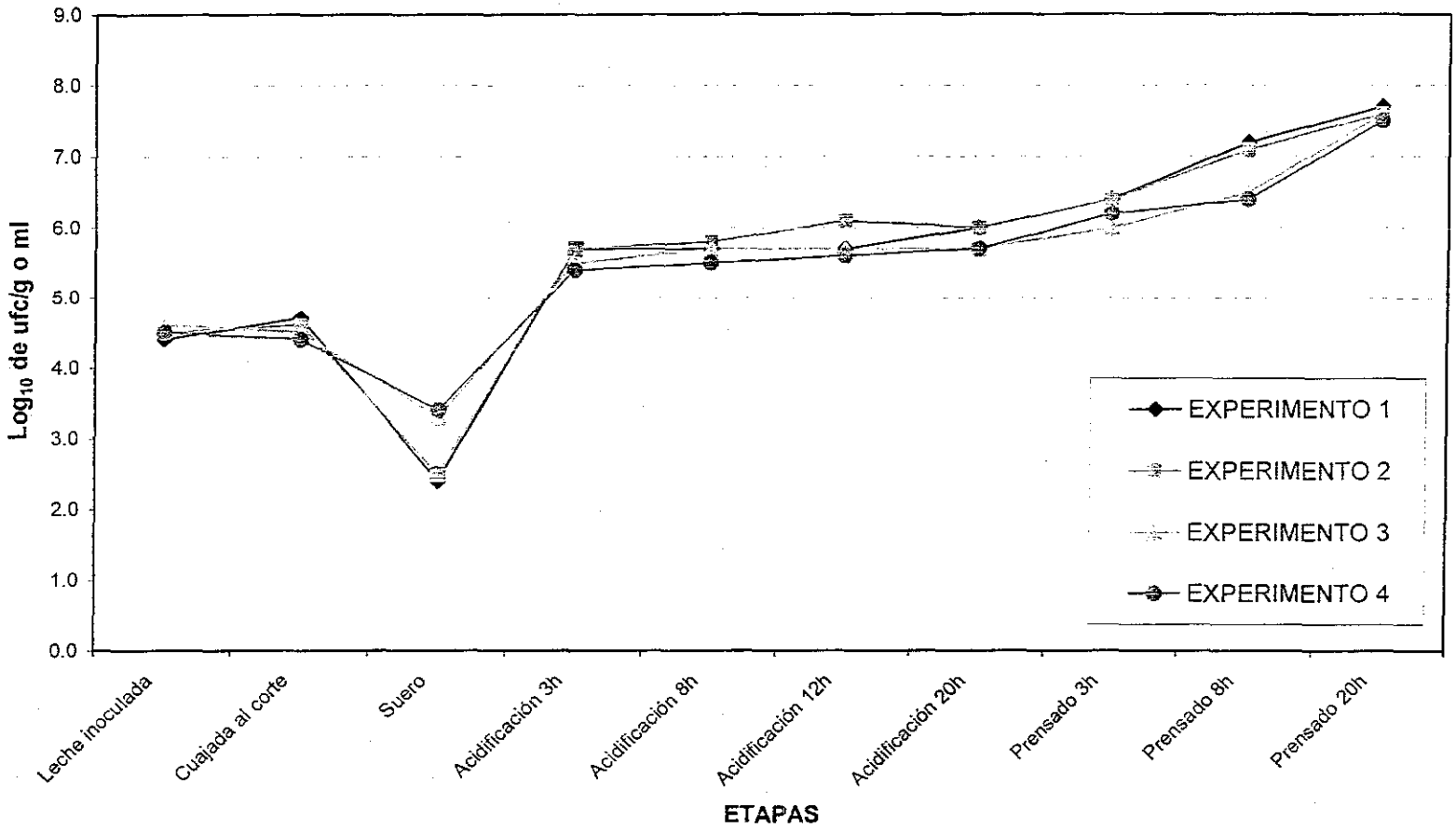


Figura 16. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633 durante la elaboración de 4 lotes de queso adobera.

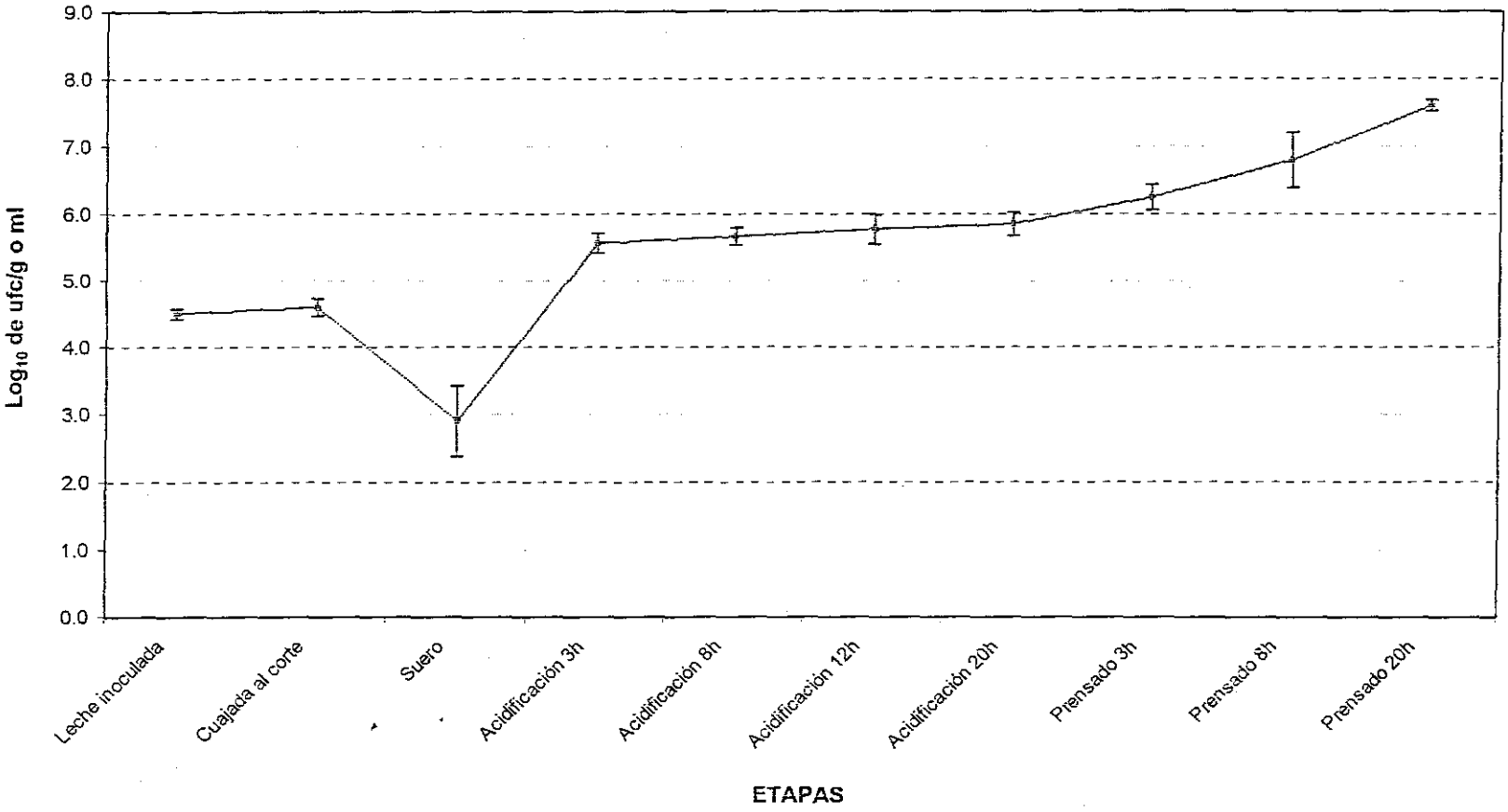


Figura 17. Comportamiento y Desviación estándar de *Listeria monocytogenes* 1633 durante la elaboración de queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de 4 experimentos (I = Desviación estándar)

Durante la acidificación en masa de la cuajada, la cantidad promedio de la cepa a 3, 8, 12 y 20 h, se incrementó en el orden de 1.1 (DE ± 0.15), 1.2 (DE ± 0.125), 1.3 (DE ± 0.22) y 1.3 (DE ± 0.17) log de ufc/g respectivamente en relación a la leche inoculada, mientras que durante el prensado de la cuajada tal aumento fue de 1.7 (DE ± 0.191) y 2.3 (DE ± 0.408), hasta alcanzar en el producto terminado 3.1 (DE ± 0.081) log de ufc/g.

Las bacterias lácticas en los 4 experimentos mantuvieron en general el mismo nivel y tendencia que *Listeria* a pesar de que se partió con un nivel de lácticos inferior en 1.5 log en relación con el nivel de *Listeria* recuperada en la leche recién inoculada, resaltando los experimentos 3 y 4 con los mas bajos niveles. Estas bacterias lácticas alcanzaron en el producto terminado 7.5, 7.8, 7.6 y 7.7 log de ufc/g respectivamente, mientras que *Listeria* llegó a 7.7, 7.6, 7.6 y 7.5 log de ufc/g respectivamente (Figuras 18, 19, 20 y 21).

En general el pH en los 4 experimentos se comportó de manera similar disminuyendo lentamente con promedios de 6.64 al inicio, hasta 5.79 en el producto final, siendo los experimentos 1 y 2 los que presentaron los pHs mas bajos (Figuras 18, 19, 20 y 21).

La acidez en porciento de ácido láctico por experimento se muestra en las figuras 18, 19, 20 y 21), mientras que la acidez promedio la cual aumentó progresivamente de 0.147 en la leche sin inocular hasta 0.466 en el producto terminado (Figura 22).

La prueba estadística de Correlación (r) lineal de Pearson mostró: a) en acidificado en masa 20 h, correlación significativa ($p < 0.05$) con valor positivo entre *L. monocytogenes* y acidez. Además de una r altamente significativa ($p < 0.01$) a valor positivo entre *L. monocytogenes* y pH. b) durante el prensado 8 h, resultó una r significativa positiva entre *L. monocytogenes* y lácticos, y correlación significativa con valor negativo, entre *L. monocytogenes* y pH, así como una r altamente significativa entre *L. monocytogenes* y acidez.

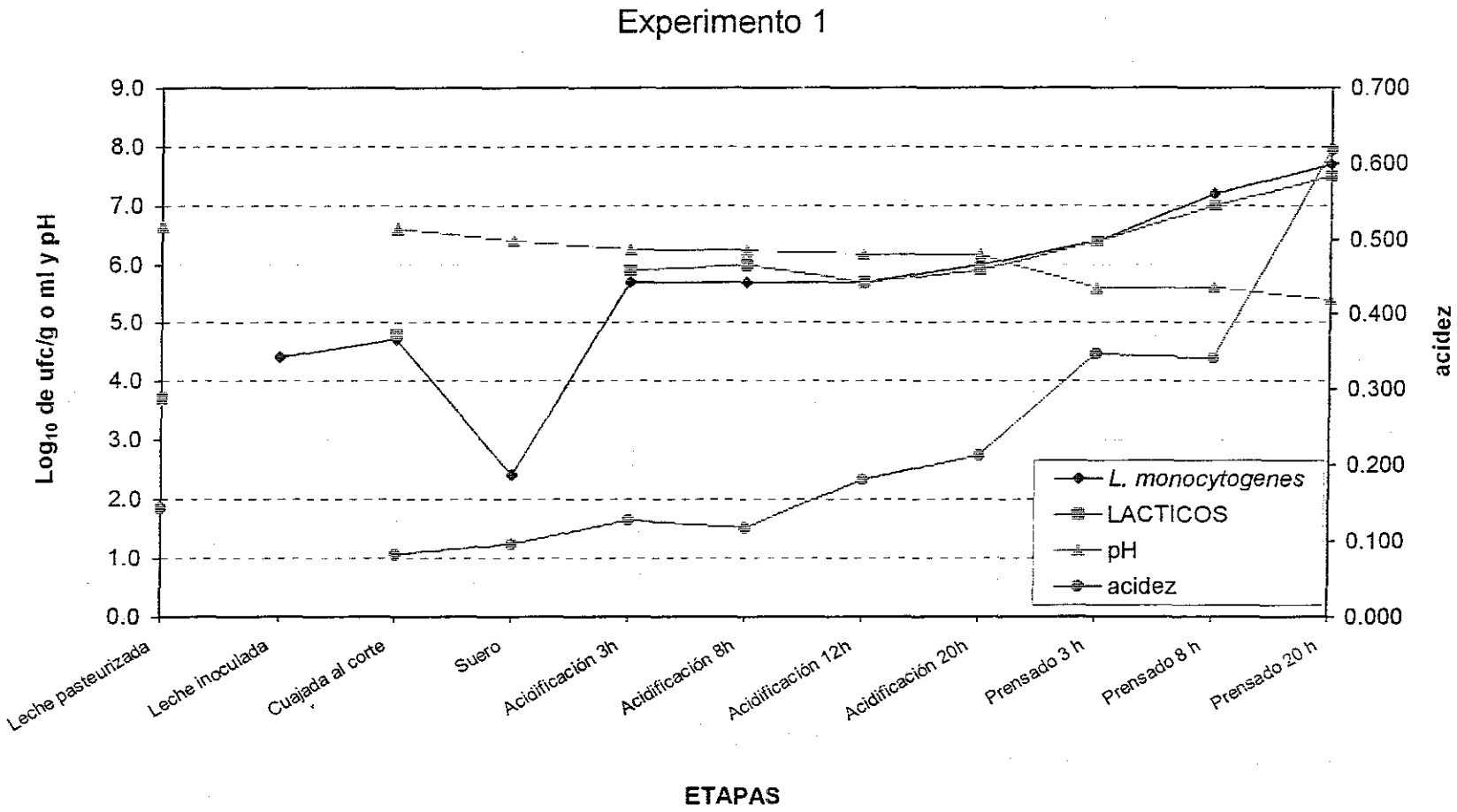


Figura 18. *Listeria,* lácticos, acidez y pH durante la elaboración de queso adobera con leche contaminada con *Listeria monocytogenes* 1633

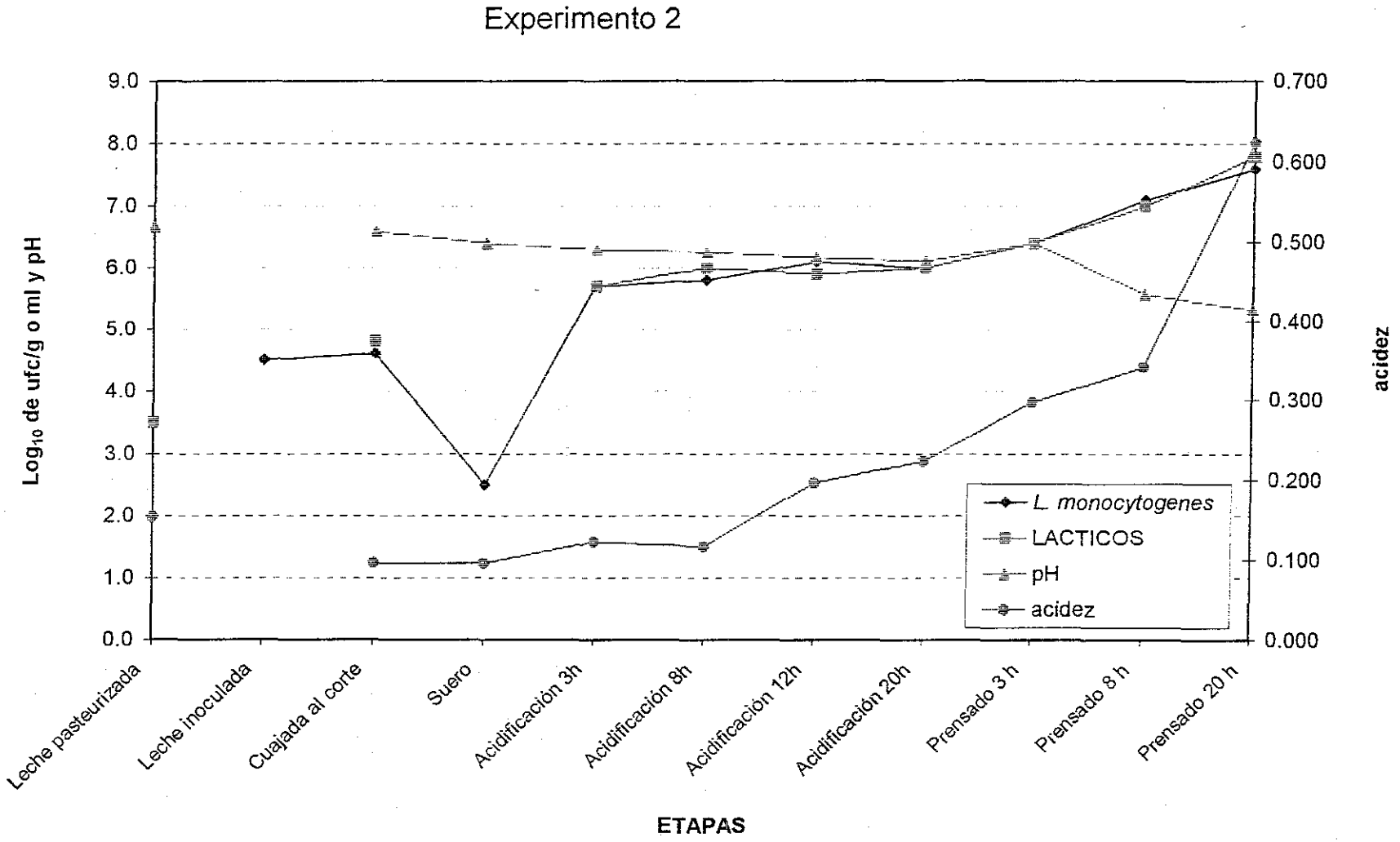


Figura 19. *Listeria,* lácticos, acidez y pH durante la elaboración de queso adobera con leche contaminada con *Listeria monocytogenes* 1633

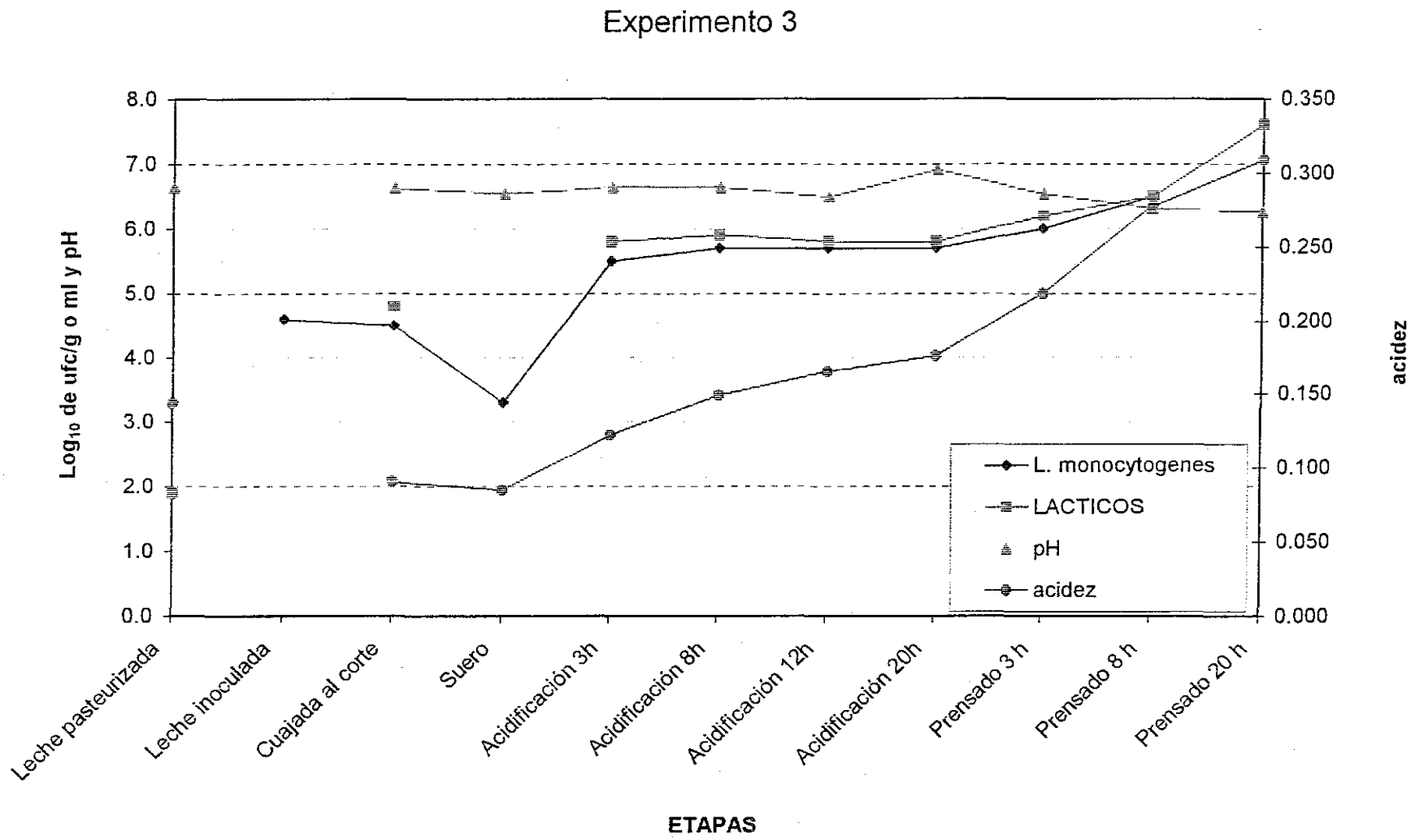


Figura 20. *Listeria,* lácticos, acidez y pH durante la elaboración de queso adobera con leche contaminada con *Listeria monocytogenes* 1633

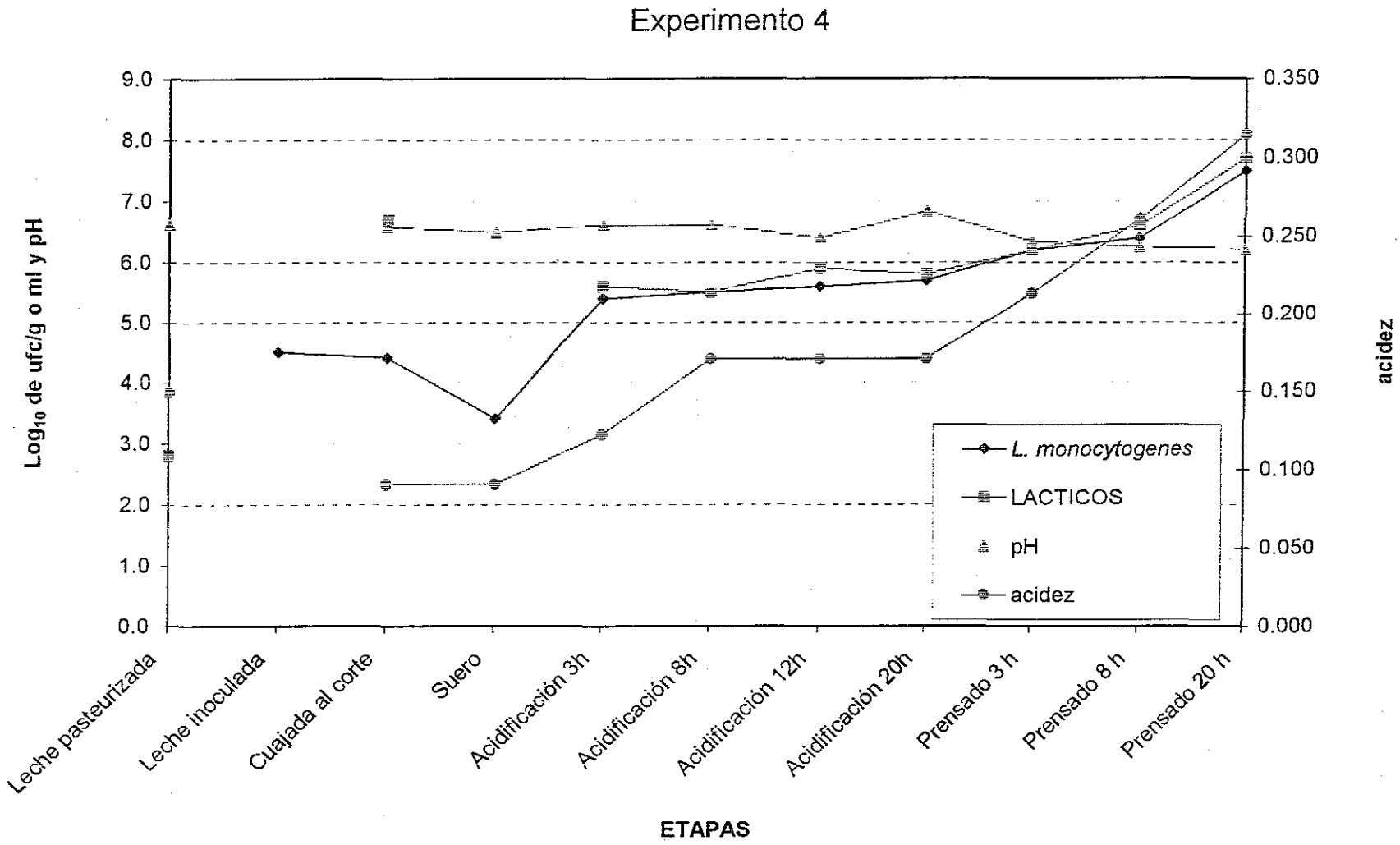


Figura 21. *Listeria,* lácticos, acidez y pH durante la elaboración de queso adobera con leche contaminada con *Listeria monocytogenes* 1633

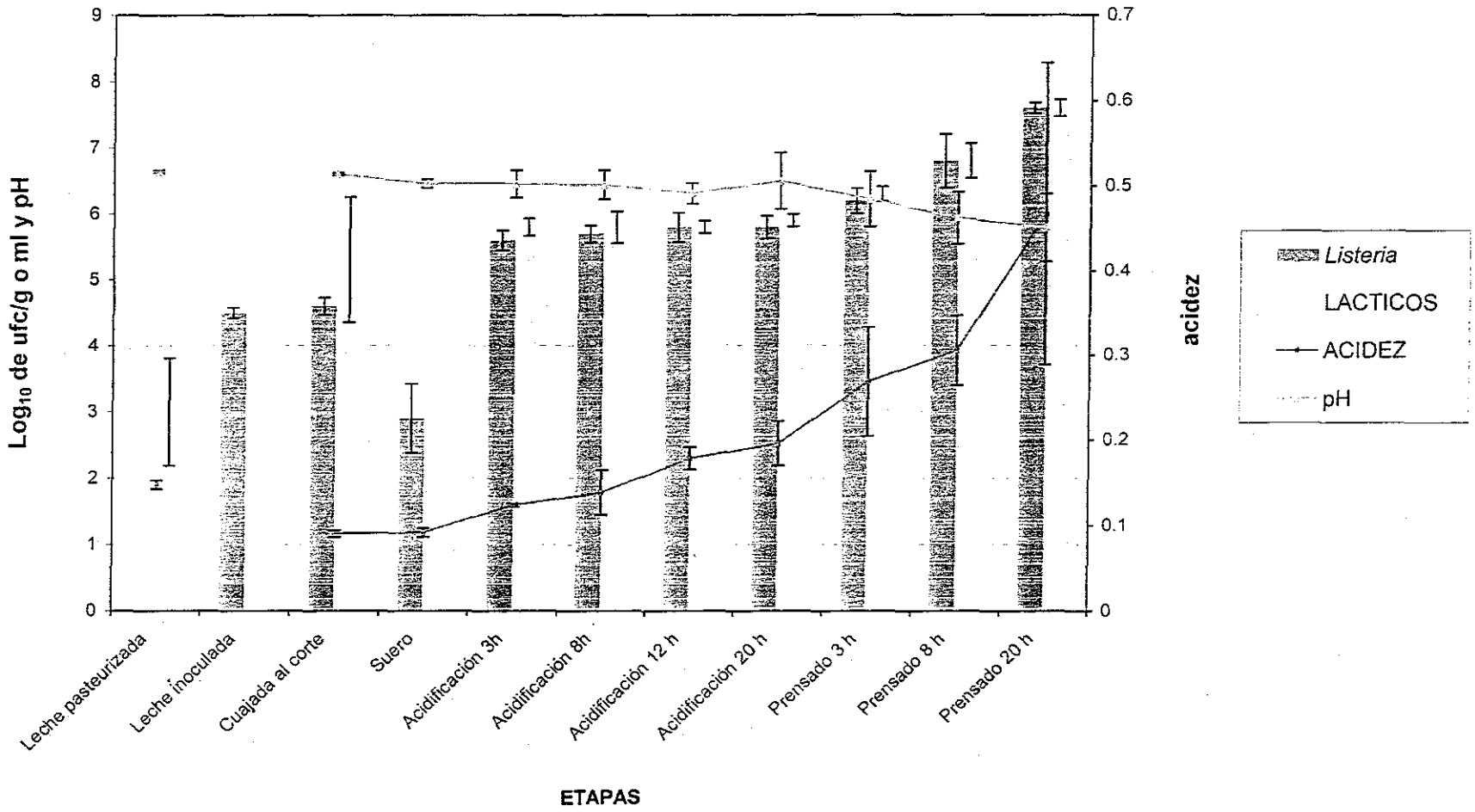


Figura 22. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, pH y acidez durante la fabricación del queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de 4 experimentos (I= Desviación estándar)

Dinámica durante el almacenamiento en refrigeración del queso adobera.

Listeria monocytogenes 1633 se multiplicó durante el almacenamiento del queso Adobera en refrigeración, resaltando los experimentos 3 y 4 donde a los 15 días aumentó a 8.5 log para luego disminuir a los 22 días a 7.8 y 8.0 log respectivamente (Figura 23), alcanzando finalmente un aumento promedio de los 4 experimentos de 8.0 (DE $\pm$ 0.10) log de ufc/g, lo que representó aumentos de 0.4 y 3.5 log de ufc/g con relación al queso Adobera al inicio del almacenamiento (Figura 24) y a la leche recién inoculada, respectivamente (Figura 30).

Respecto al comportamiento de la flora láctica, en los cuatro experimentos los niveles y tendencias se presentan similares a *Listeria* (Figuras 25, 26, 27 y 28).

La tendencia del pH en los cuatro experimentos fue a disminuir progresivamente a excepción de los experimentos 1 y 2 a los 22 días donde tuvo un ligero aumento (Figura 25, 26, 27 y 28). El pH promedio fue de 5.79 a 5.21 para el tiempo cero y 22 días, respectivamente (Figura 29).

Durante el almacenamiento del queso Adobera en refrigeración, la acidez en los experimentos 3 y 4 mostró un incremento progresivo a los 8, 15 y 22 días de almacenamiento, mientras que en los experimentos 1 y 2 aunque tendió a aumentar, el mayor aumento se presentó en el día 15, para luego disminuir ligeramente en el día 22 (Figuras 25, 26, 27, 28 y 29). La tendencia global de la dinámica de *Listeria monocytogenes* y los cambios concurrentes en la flora láctica, pH y acidez durante la fabricación y almacenamiento del queso adobera, se presenta en la figura 30.

La prueba de Correlación (r) lineal de Pearson durante el almacenamiento en refrigeración del queso adobera, mostró a 15 días, una r significativa ($p < 0.05$) negativa entre *L. monocytogenes* y acidez.

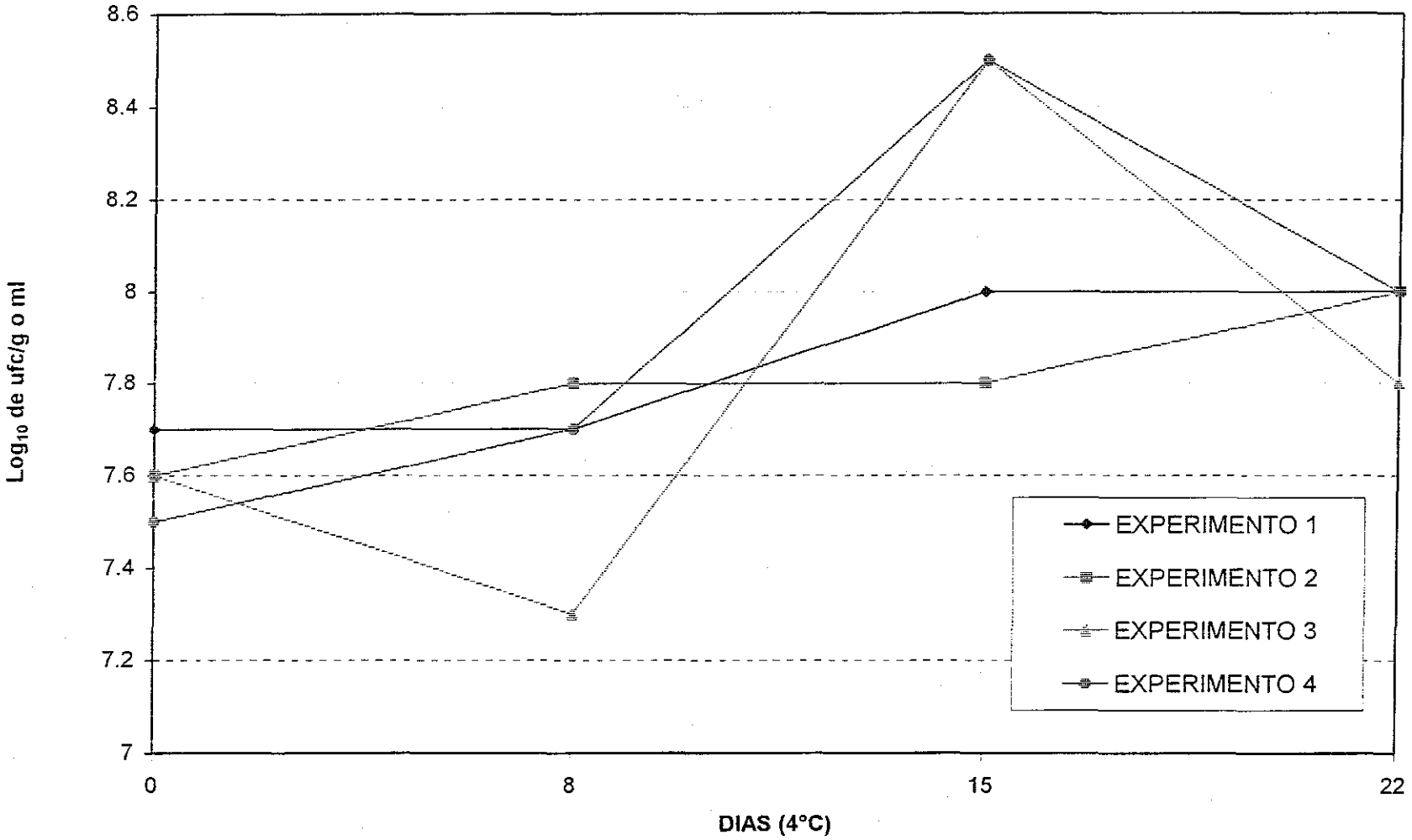


Figura 23. *Listeria monocytogenes* 1633 durante el almacenamiento en refrigeración de cuatro lotes de queso adobera

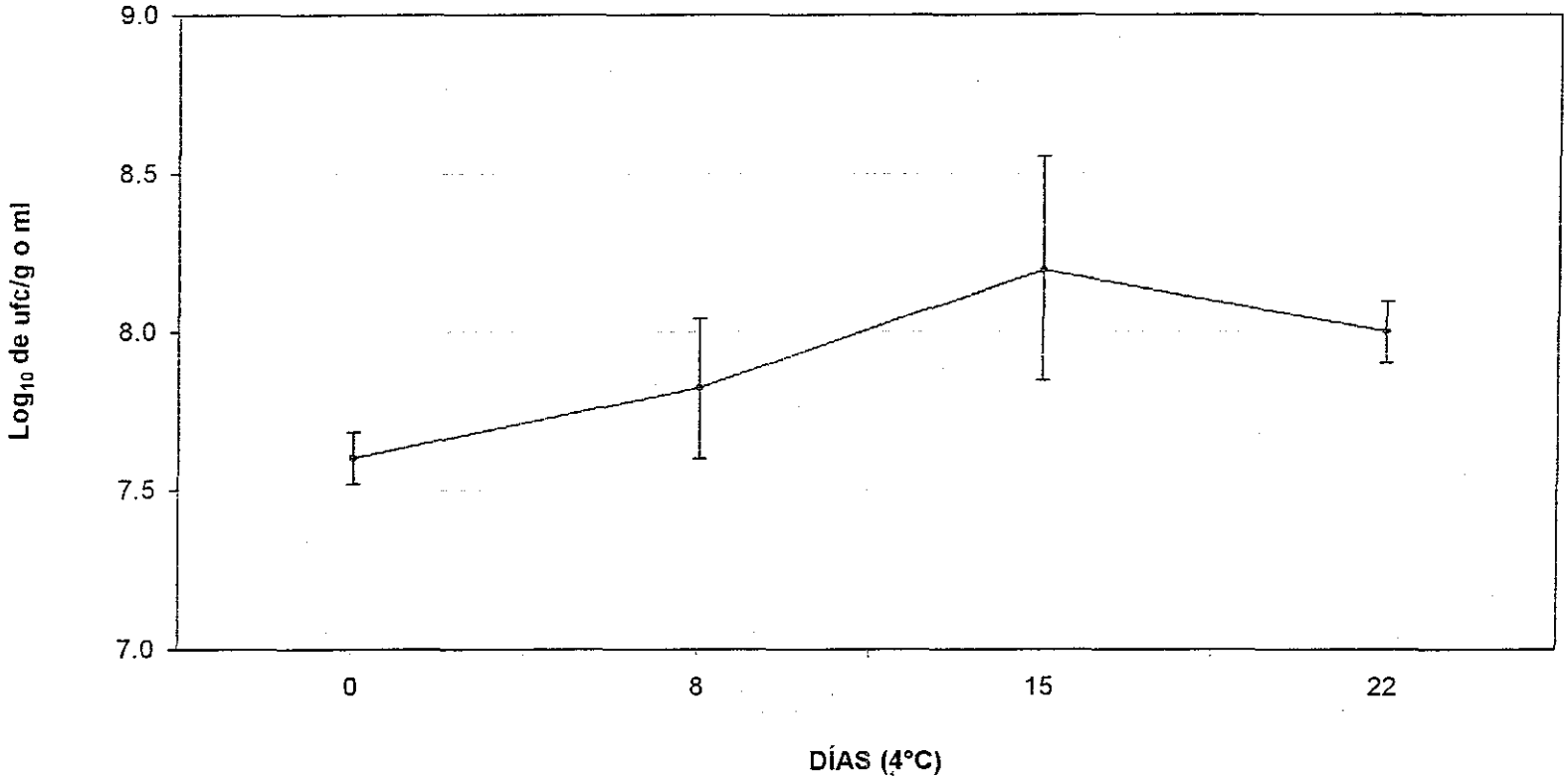


Figura 24. Comportamiento y Desviación estándar (I) de *Listeria monocytogenes* 1633 durante el almacenamiento en refrigeración de queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de 4 experimentos.

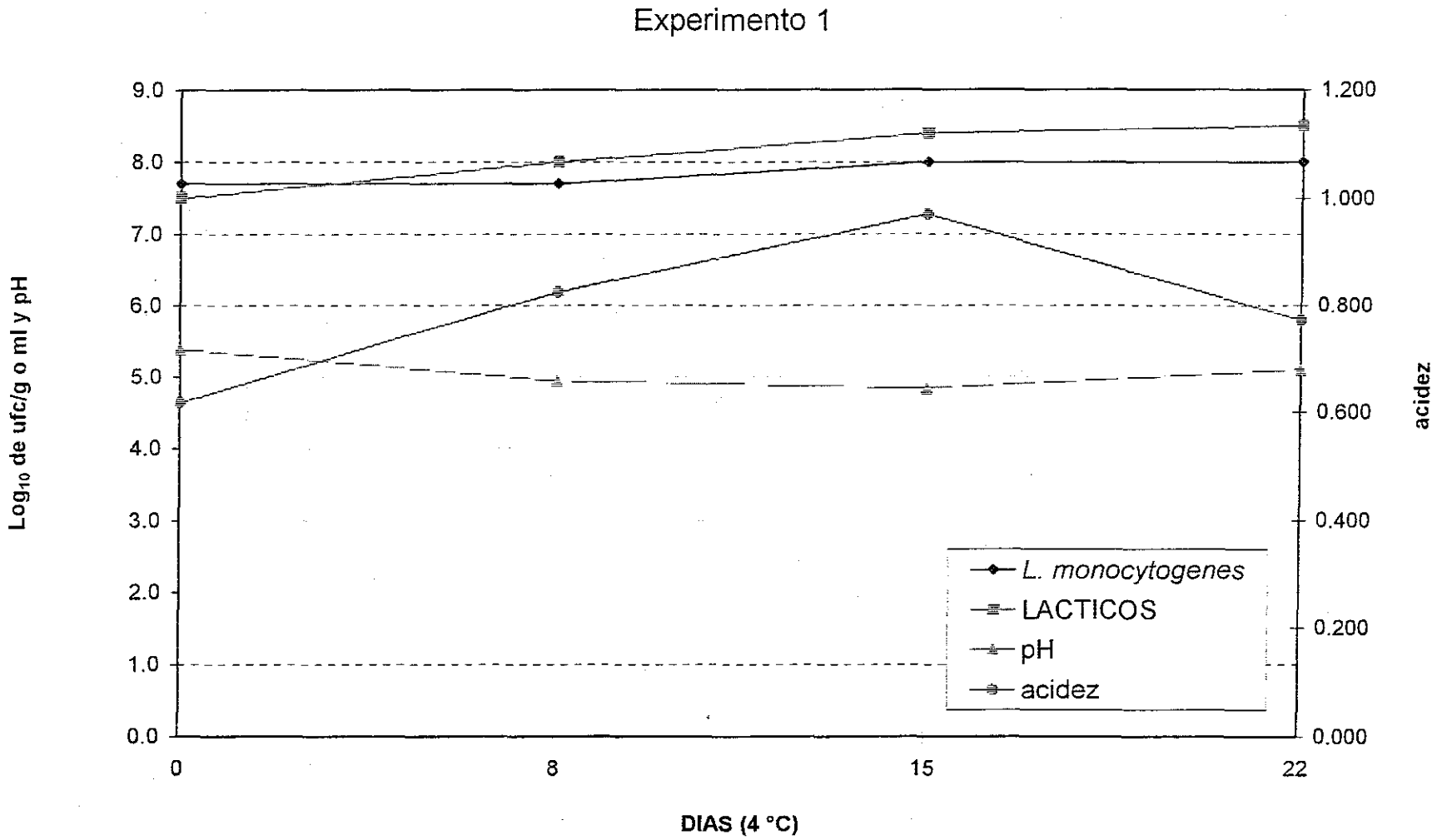


Figura 25. *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, acidez y pH durante el almacenamiento de queso adobera en refrigeración por 22 días a 4°C.

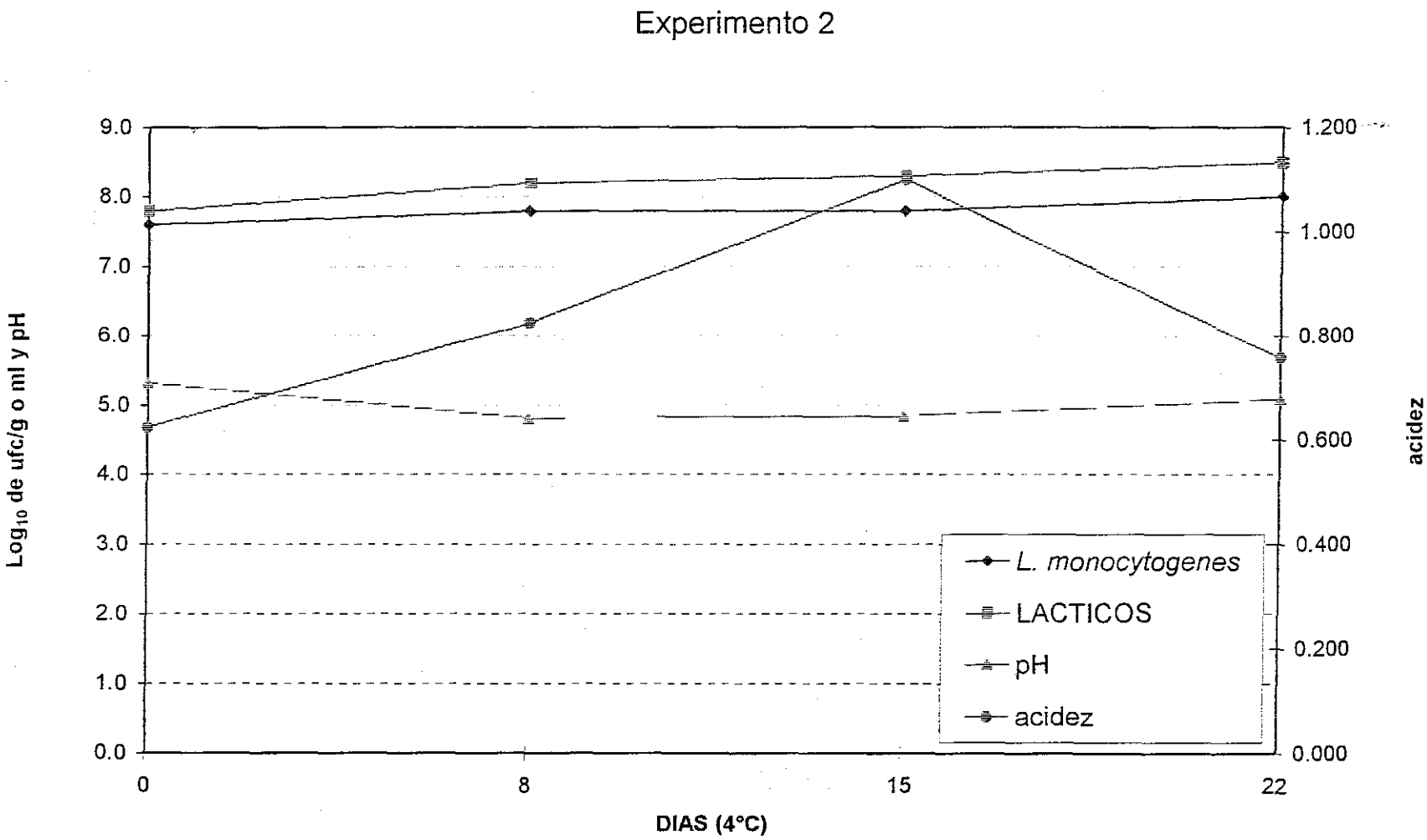


Figura 26. *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, acidez y pH durante el almacenamiento de queso adobera en refrigeración por 22 días a 4°C .

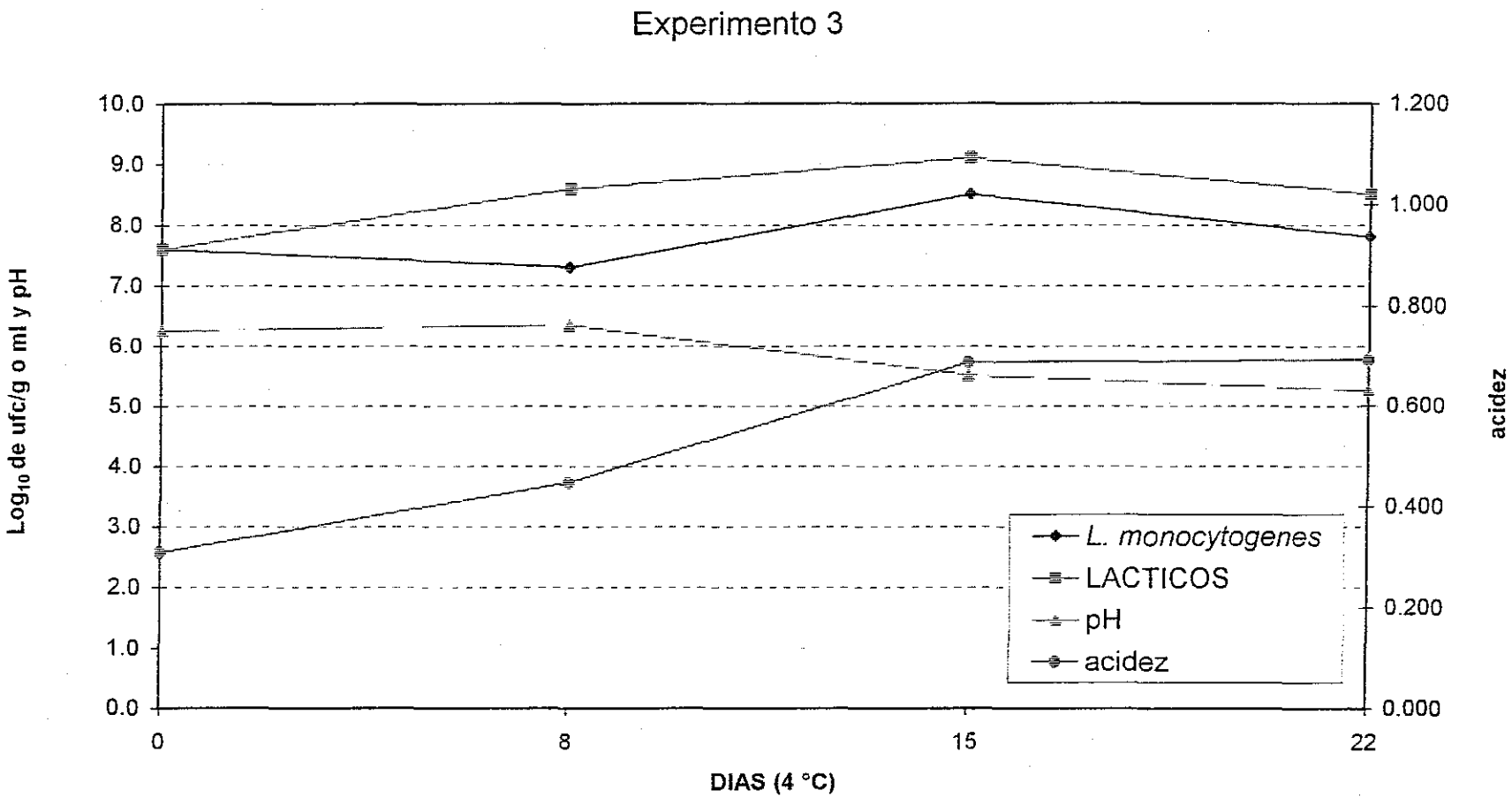


Figura 27. *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, acidez y pH durante el almacenamiento de queso adobera en refrigeración por 22 días a 4°C.

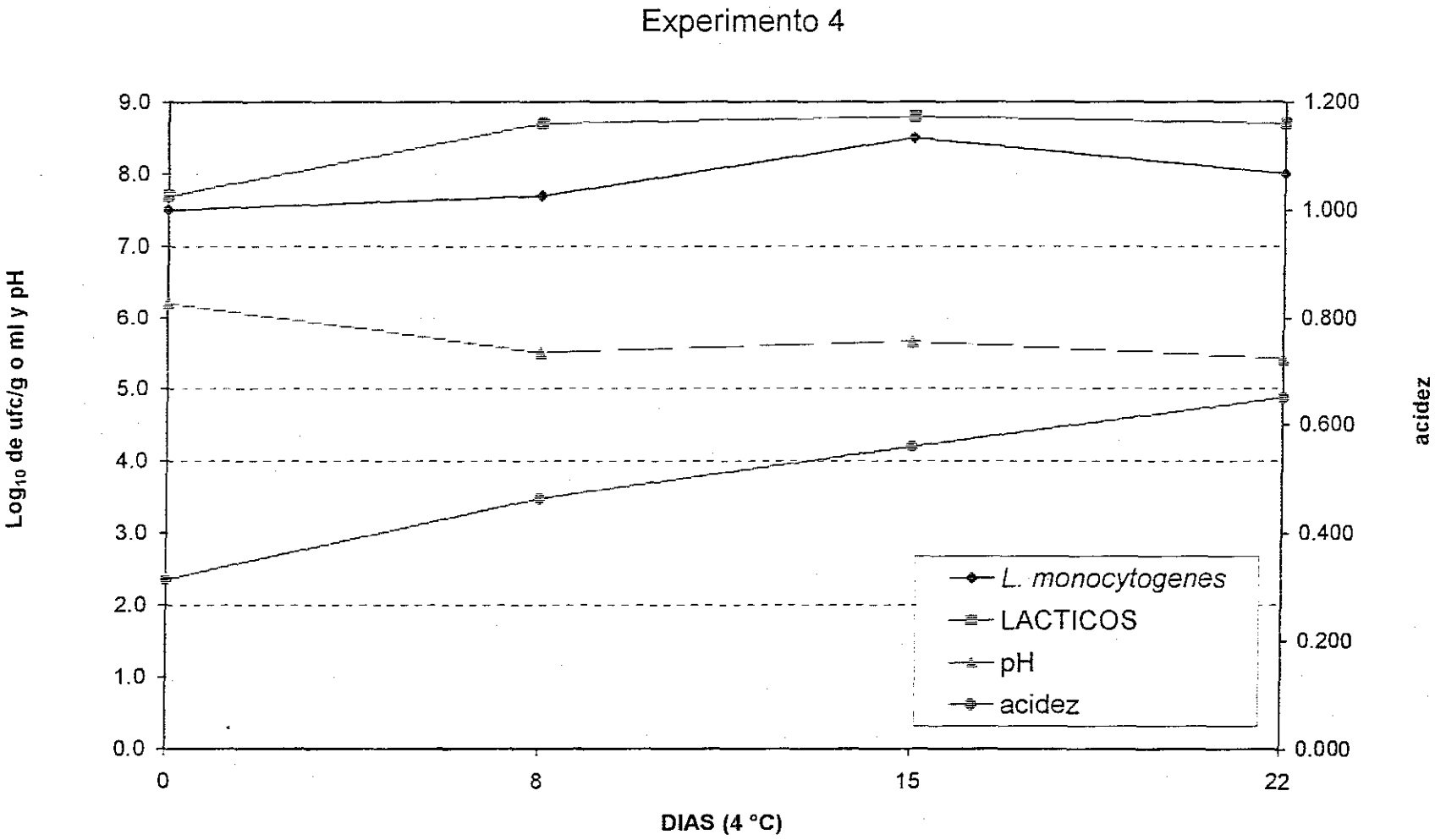


Figura 28. *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, acidez y pH durante el almacenamiento de queso adobera en refrigeración por 22 días a 4°C.

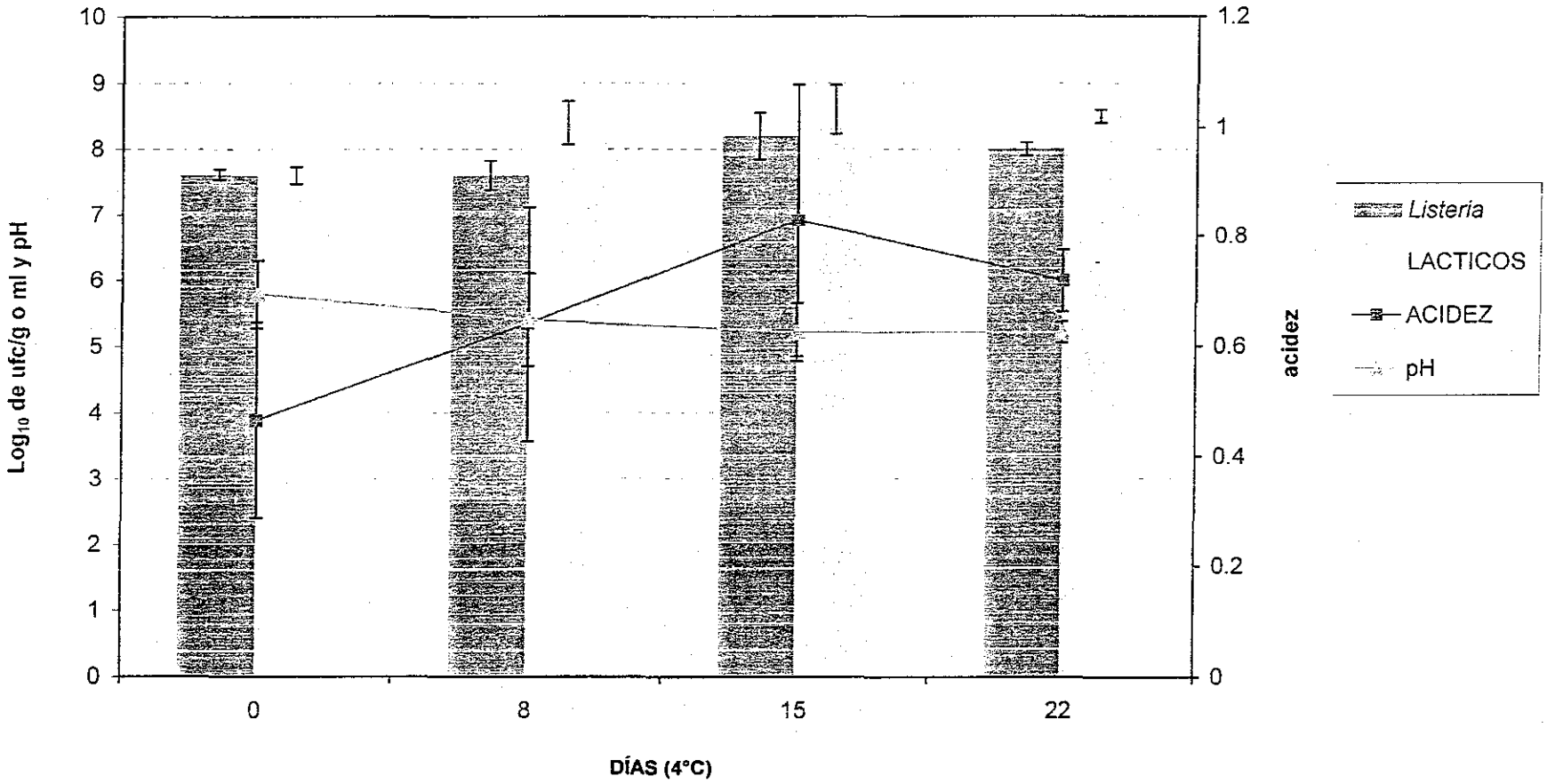


Figura 29. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, pH y acidez durante el almacenamiento por 22 días a 4°C del queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de 4 experimentos (I= Desviación estándar)

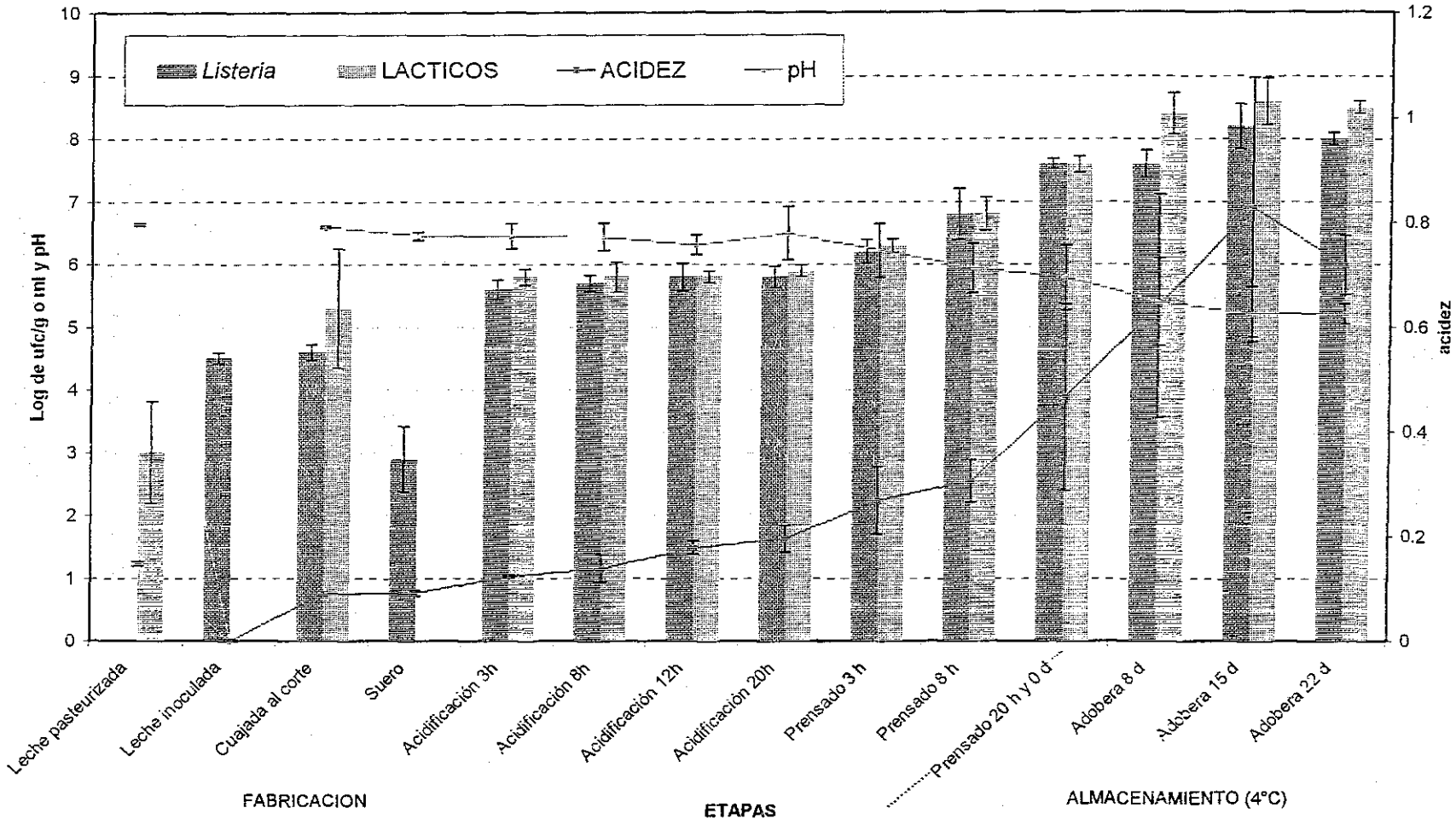


Figura 30. Comportamiento de *Listeria monocytogenes* 1633, lácticos, pH y acidez durante la fabricación y almacenamiento del queso adobera. Cada punto representa el resultado promedio de cuatro experimentos. (I= Desviación estándar)

7. DISCUSIÓN

7. DISCUSION

Etapa 1.- Frecuencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en queso fresco Adobera elaborado con leche pasteurizada que se expende en tiendas de autoservicio.

Según Garzaroli y Rondinini (1992) la identificación y cuantificación de *Listeria spp.* en quesos blandos frecuentemente es difícil, debido a la presencia de otros microorganismos, especialmente bacterias ácido lácticas del genero *Streptococcus*, que pueden desarrollar colonias morfológicamente similares a las especies de *Listeria*, y que además en algunos casos crecen sobre las colonias de *Listeria*. A pesar de esto, en este estudio se encontró una elevada positividad global a *Listeria* (38.6 %) en el queso Adobera elaborado con leche pasteurizada, lo que llama la atención, por ser ligeramente superiores a las cifras reportadas en México para quesos elaborados con leche cruda, 34 y 32 % en queso fresco Panela y Ranchero, respectivamente, en mercados de Guadalajara (Luis Juan *et al.*, 1992a; Luis Juan *et al.*, 1992b) y el 37.6 % en quesos frescos de mercados de Michoacán (Covarrubias *et al.*, 1999), cabe mencionar que en todos estos estudios se utilizó una metodología similar y la misma cantidad de muestra analizada. Cuando se adquiere un queso en una agradable y organizada tienda de autoservicios, este queso posee una envoltura individual, se encuentra en un refrigerador, cuenta con la leyenda "elaborado con leche pasteurizada" y además pertenece a una marca de prestigio, todo esto da la sensación al cliente de que está adquiriendo un producto seguro. Sin embargo, el resultado aquí obtenido, indica que el problema va mas allá de una simple apreciación y que puede deberse a la ubicuidad del germen, a la presencia de *L. monocytogenes* como contaminante del medio ambiente de las plantas de lácteos (Cotton y White., 1992; Cox *et al.*, 1989b; Klausner y Donnely, 1991; NACMCF, 1991) y a su capacidad para multiplicarse en refrigeración, entre otros.

La frecuencia de *L. monocytogenes* en queso Adobera obtenida en este trabajo 17 (16 %), resulta similar a la reportada por Covarrubias *et al.* (1999), en queso Panela de leche cruda en mercados de Michoacán y elevada si la comparamos con el 2% que reportan Vizcaíno y Mustre (1992), en quesos frescos de mercados de Chalco, Estado de México y el 7 % que obtuvo Galindo *et al.* (1996), en queso frescos con marca y de elaboración casera en el Distrito Federal. Por otra parte al comparar nuestros datos con los procedentes de países industrializados consignados por diversos autores quienes reportan incidencias en quesos blandos entre 0.5 y 10.1 % (Beckers et al., 1987; Farber et al., 1989; Genigeorgis, *et al.*, 1991; Greenwood *et al.*, 1991; Massa *et al.*, 1990; Pini y Gilbert, 1988; Venables, 1989) encontramos diferencias importantes. Cabe indicar que las comparaciones directas resultan difíciles, ya que en algunos de los estudios anteriores se utilizaron métodos diferentes al nuestro, y si bien algunos estudios se realizaron en quesos elaborados con leche cruda, en su mayoría no se registró el tipo de leche empleada en el proceso. La baja incidencia señalada por Vizcaíno y Mustre (1992), puede deberse a que no obstante que utilizan una técnica complicada analizan sólo un gramo de muestra, mientras que en este estudio se emplearon 25 g para el análisis. La frecuencia de *L. monocytogenes* aquí presentada resulta menor en relación con lo reportado para el queso Panela y Ranchero (27 y 23 %, respectivamente) de mercados de Guadalajara (Luis Juan *et al.*, 1992a; Luis Juan *et al.*, 1992b) y el 23 % en queso ranchero de mercados de Michoacán (Covarrubias *et al.*, 1999), así como el 41.17 % (7 de 17) en queso Frescal de Minas de Río de Janeiro, Brazil (Da Silva, 1998), todos estos quesos elaborados con leche cruda.

Probablemente la alta incidencia de *L. monocytogenes* encontrada en el queso Adobera, en relación a los datos de quesos similares de países desarrollados, se deba a que las condiciones higiénicas de obtención de la leche, elaboración, almacenamiento, distribución y venta de la mayoría de los quesos que se expenden en supermercados de la ZMG, difieren enormemente

de las de aquellos países. Particularmente con los quesos Adobera, a pesar de que se elaboran con leche pasteurizada como ya se mencionó, es posible la eventual entrada de leche contaminada con *Listeria* a la planta, ya que en un estudio previo se encontró que un 7 % de la leche cruda que se expende a granel en la ciudad de Guadalajara resultó positiva a *Listeria* (Luisjuan *et al.*, 1995b), y a nivel internacional se maneja una frecuencia promedio del 2 % (Farber y Peterkin, 1991). En consecuencia la instalación del patógeno en las plantas de lácteos, dando como resultado la contaminación postpasteurización y la posible sobrevivencia y/o multiplicación durante el almacenamiento, incluso durante su venta. La Norma Oficial Mexicana (Secretaria de Salud, 1994) menciona que "la exhibición y venta de los quesos se permite en locales que tengan las condiciones de higiene y limpieza y que cuenten con equipo de refrigeración para conservar el producto a la temperatura máxima de 7 °C", y si bien *L. monocytogenes* tiene la capacidad de multiplicarse en refrigeración, al tiempo del muestreo se observó en algunos casos un franco abuso de temperatura (hasta 12 °C) durante su comercialización. Los factores antes mencionados favorecen la contaminación y desarrollo en estos productos no sólo de *Listeria*, sino además de otros patógenos.

Existen dos estudios que sobresalen por su elevada incidencia de *L. monocytogènes* en queso (50 % y 87 %), sin embargo, en cada caso todas las muestras provenían de una misma fábrica y una de estas donde el queso se elaboraba con leche cruda de cabra, estaba implicada en un caso de listeriosis (Farber y Peterkin, 1991; McLauchlin *et al.*, 1990).

La recuperación de *L. monocytogenes* como aislamiento único 11 (10.3 %) en este trabajo, fue similar a lo reportado por Luis Juan *et al.* (1999), en requesón (11.3 %) y más alta que lo que reportan Beckers *et al.* (1987), (10.14%) y Pini y Gilbert (1988), (7.3 %) en quesos blandos, mientras que Mc Lauchlin *et al.* (1990), reportan un porcentaje mayor (40.8 %) en queso de cabra, así como Luis Juan *et al.*, (1992a) y Luis Juan *et al.*, (1992b)

también reportan 17 y 16 % para el queso Panela y Ranchero, respectivamente.

La frecuencia global de *Listeria* en este estudio incluyó la presencia de cinco especies de *Listeria*, destacando *L. innocua* en 27 (25.4 %) muestras. Otros autores encuentran también a *L. innocua* como la especie distinta del *L. monocytogenes* que ha sido aislada con mayor frecuencia a partir de quesos ((Luis Juan *et al.*, 1992a; Luis Juan *et al.*, 1992b; McLauchlin *et al.*, 1990; Pini y Gilbert, 1988). *L. monocytogenes* es la única especie del género *Listeria* considerada como un patógeno importante para el humano. Las demás especies, ya sea nunca o muy raramente han estado relacionadas con la infección, sin embargo, la detección en alimentos de cualquier especie de *Listeria* diferente a *L. monocytogenes* conlleva un alto riesgo de contaminación con *L. monocytogenes* debido a que la fisiología y el habitat de las diferentes especies es similar (McLauchlin *et al.*, 1990). *L. innocua* es un buen indicador de *L. monocytogenes:* cuando se buscan fuentes de *Listeria* la presencia de ambas especies es igualmente significativa (Seeliger, 1988).

Es probable que los factores mencionados con anterioridad y el mayor numero de muestras estudiadas por marca en este estudio, sean la causa del 100 % de positividad a *Listeria* para la categoría de marcas de queso Adobera de alta distribución, y también estos factores junto con el mayor número total de muestras estudiadas, sea la causa de la mayor frecuencia de muestras positivas en las marcas de mediana distribución.

El hecho de que la mayoría (15 de 24) de las marcas de queso Adobera hayan resultado positivas a *Listeria,* indica que el problema de contaminación es generalizado y que radica principalmente en las plantas de lácteos, por lo que los productores deben implementar buenas practicas higiénicas en la obtención de la leche y los fabricantes de queso deben tomar conciencia sobre la importancia de las condiciones sanitarias de las materias primas, equipo, proceso, medio ambiente y personal en las plantas, con el fin de ofrecer al consumidor un producto inocuo.

Respecto a la eficiencia de los medios de aislamiento de *Listeria* utilizados, el agar LPM fue superior al medio MOX, ya que el primero detectó el 87.8 % de los aislamientos, mientras que el MOX condujo a un 36.5 % de falsos negativos. Esto concuerda con lo reportado por Covarrubias *et al.*, (1999), donde el LPM fue superior al MOX, aunque hubo una mínima diferencia (53 y 47 %, respectivamente). Por su parte Westoo *et al.*, (1992), señalan que en su estudio el MOX fue superior al LPM. No se descarta la posibilidad de que debido a que nuestro grupo de trabajo ha estado utilizando por algún tiempo el LPM para el reconocimiento de las colonias de *Listeria*, esto haya influenciado los resultados obtenidos.

En cuanto al tiempo de incubación del caldo de enriquecimiento, los resultados indican la importancia de intentar el aislamiento en los 2 tiempos. Independientemente del medio de aislamiento, se producen resultados falsos negativos cuando sólo se emplea un tiempo de incubación (Cuadro 16).

Todas las muestras de queso Adobera positivas a *Listeria* en nuestro estudio tuvieron un pH entre 4.41 y 6.23, valores más bajos en su limite inferior que los obtenidos por Genigeorgis *et al.* (1991); Pini y Gilbert (1988) y McLauchlin *et al.*, (1990), quienes reportan valores de pH de 6.0 a 6.5 para las muestras positivas, mientras que en el queso Panela y Ranchero de Guadalajara (Luis Juan *et al.*,1992a; Luis Juan *et al.*,1992b), los límites de pH de los quesos estudiados, fueron (5.2-6.8 y 6.1-6.6 respectivamente), y en los quesos frescos de Michoacán (4.5 a 6.5), ligeramente mas altos. Debido a que *Listeria* puede crecer a límites de pH entre 5.0 y 9.6 (Lovett, 1989b), los valores aquí obtenidos muestran que *Listeria* se aisló, no solo en los quesos Adobera que tenían los valores de pH convenientes para el desarrollo de este patógeno, sino que el 10 % de los quesos positivos tenían pHs más bajos. En estas condiciones es de esperar que el germen se encontrara sobreviviendo, según lo reportado en otros productos ácidos como el yogurt (Farber y Peterkin, 1991).

Ya que la mayoría (62.5 %) de las marcas de queso Adobera estudiadas, así como el total de marcas de alta distribución y 54.2 % de las muestras de las marcas de mediana distribución resultaron positivas a *Listeria*, es posible que la contaminación se deba principalmente a la presencia de *L. monocytogenes* como contaminante del medio ambiente de las plantas de lácteos donde se elaboran tales quesos. Según algunos autores (Cotton y White, 1992; Cox *et al.*, 1989b; Klausner y Donnely, 1991; NACMCF, 1991), es común que la bacteria contamine el medio ambiente de las plantas procesadoras de alimentos, especialmente las de lácteos.

Etapa 2.- Nivel de contaminación por *Listeria* en queso Adobera positivo a la presencia de *Listeria*.

Aunque se desconoce la dosis infecciosa oral, el brote de California indica que se requieren varios cientos o pocos miles de células para ciertos segmentos de la población (Linnan *et al.*, 1988). Aunque no se pueden aplicar directamente a la población humana, varios estudios en ratones inmunocomprometidos han mostrado una LD_{50} en el rango de, aproximadamente, 10 y entre 4 a 480 células de *L. monocytogenes* cuando se administra el patógeno por vía oral o intraperitoneal, respectivamente (Ryser, 1999b). En consecuencia, debido a una obligación moral al público, a que la dosis infecciosa oral y el riesgo relativo para individuos susceptibles se pueda establecer firmemente, la FDA adoptó y continúa manteniendo una política de "cero tolerancia" respecto a la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos "listos para comer" y continúa decomisando los productos que contienen este patógeno en cualquier nivel detectable. Sin embargo, en la mayoría de países Europeos han adoptado políticas mas relajadas, que intentan prevenir la distribución y venta de queso (y algunas veces otros alimentos listos para el consumo) que contengan >100 ufc/g o ml de *L. monocytogenes* (Ryser, 1999b).

Debido a que cerca del 90 % de los quesos Adobera aquí estudiados tenían entre >100 y 3.7×10^5 ufc/g de *Listeria*, y en México la listeriosis no

es de reporte abligatorio aún cuando la Norma Oficial Mexicana (Secretaría de Salud, 1994) señala que "cuando la Secretaria de Salud de acuerdo al muestreo y a los resultados del análisis microbiológico detecte la presencia de *L. monocytogenes*, ordenará la realización de un plan de trabajo por parte del fabricante o importador para controlar la presencia de dicho microorganismo", su determinación microbiológica en alimentos no se realiza de rutina. Si así fuera, el diagnóstico acasionaría que la mayoría de los quesos estudiados se decomisaran, ya que no cumplirían la norma Mexicana (negativo en 25 g), ni con las Europeas (Ryser, 1999b).

Resultados similares a los nuestros, han sido reportados por Beckers *et al.*, (1987), Pini *et al.*, (1988), Tham y Danielsson-Tham (1988), Eliertz *et al.*, (1993), quienes cuantificaron *L. monocytogenes* en quesos blandos elaborados, ya sea con leche cruda o pasteurizada, y los niveles encontrados van desde < 10 hasta 2.9×10^7. Lo mismo ocurre con el estudio realizado por Covarrubias *et al.*, (1999), quienes reportan en 3 quesos frescos estudiados, valores de 1.0×10^5, 5.6×10^3 y de 1.0×10^2, respectivamente.

Garzaroli y Rondinini (1992), señalan que en los medios Oxford y Palcam se obtuvieron mejores resultados respecto a otros medios durante la cuantificación de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos, sin embargo, en nuestro estudio encontramos que algunas colonias que presentaban las características típicas de *Listeria* tuvieron que ser descartadas después de las pruebas de confirmación.

Etapa 3.- Comportamiento de una cepa nativa de *Listeria monocytogenes* y cambios concurrentes en la flora láctica, pH y acidez titulable, durante la elaboración y almacenamiento de queso Adobera.

L. monocytogenes se comporta de manera diferente en los distintos tipos de queso elaborados con leche inoculada con el patógeno, este comportamiento varía desde inhibición a sobrevivencia o hasta desarrollo del microorganismo (Yousef y Marth, 1988), y depende principalmente del tipo de

cepa empleada y de las diferentes condiciones de elaboración, madurado y almacenamiento del queso (composición, pH, temperatura de madurado, etc.) (Papageorgiou y Marth, 1989).

Durante la fabricación del queso Adobera, es muy probable que el ligero incremento en el número de listerias en la cuajada se haya debido a la concentración de células a causa del atrapamiento del patógeno durante la formación de la cuajada y no propiamente al desarrollo del microorganismo (Buazzi *et al.*, 1992). Estudios con *Escherichia coli y Enterobacter aerogenes* (Ryser y Marth, 1989a), así como con *Salmonella typhimurium* (Ryser y Marth, 1987), han mostrado que en la cuajada, típicamente se observa un aumento de 10 veces su número debido a este efecto, sin embargo, tal magnitud de incremento no se observó con *L. monocytogenes* en este estudio. Otros autores en investigaciones realizadas en quesos como el Camembert (Ryser y Marth, 1989a), Cheddar (Ryser y Marth, 1987) y Cottage (Ryser *et al.*, 1985), han reportado resultados similares al de este estudio y además concuerda con los hallazgos en queso Panela obtenidos por nuestro grupo en un estudio anterior a este (Luis Juan *et al.*, 1995a).

El aumento global de *L. monocytogenes* 1633 (mas de 1000 veces) observado en el queso Adobera durante su fabricación, pudo deberse entre otros a un alto contenido de humedad (47 %) propio de este tipo de queso; valores de pH (6.64 a 5.79) cercanos al neutro y una temperatura de elaboración dentro de las consignadas para permitir su desarrollo (Jones, 1990; Lovett, 1989b). Aún cuando en la elaboración del queso Adobera no se adicionan cultivos lácticos, se sabe que la leche pasteurizada contiene flora láctica termodúrica y el efecto inhibidor hacia algunos patógenos transmitidos por alimentos a consecuencia de cultivos lácticos iniciadores es bien reconocido y esto se acepta también para *L. monocytogenes* (Pearson y Marth, 1990). Shaack y Marth (Schaack y Marth, 1988a) reportan que *Streptococcus cremoris y Streptococcus lactis* inhiben en distintos grados a *L. monocytogenes* en leche descremada, y aunque en ese estudio ambas cepas

(V7 y OH) probadas sobrevivieron después de 15 h de fermentación, posteriormente crecieron en algún grado. Los autores referidos (Lovett, 1989b) reportan también que *Lactobacillus bulgaricus* es más inhibitorio para *L. monocytogenes* que *Streptococcus thermophilus* en leche descremada. Los límites de sobrevivencia de *L. monocytogenes* en leche descremada son de 12 horas a 37 semanas, y en general las temperaturas más elevadas de fermentación, tanto para cultivos lácticos iniciadores mesófilos (30 °C) como para termófilos (42 °C), generan tiempos más cortos de sobrevivencia del patógeno (Shaack y Marth, 1988c). Cuando la mezcla del yogurt fermentado (con una combinación de lácticos) a 45 °C, contiene 10^3 a 10^4 *L. monocytogenes,* el patógeno sobrevive la fabricación del yogurt de 1 (pH final 4.13) hasta 12 días (pH final 3.93) durante el almacenamiento del producto en refrigeración (Shaack y Marth, 1988c). En otro reporte, en queso Panela elaborado con leche cruda, *Salmonella* (a inóculos de 1100/ml) se inactivó antes de 24 h durante la elaboración (Fernández *et al.*, 1983). En esos quesos el pH varió de 6.05 a 5.39 (Fernández *et al.*, 1982), y más que este parámetro, lo que parece influir en la muerte del patógeno es la actividad de la flora asociada, principalmente de las bacterias lácticas, provenientes de la leche cruda, que muestran un efecto antagónico sobre diferentes bacterias enteropatógenas (Fernández *et al.*, 1984).

En este estudio aún cuando los niveles iniciales de lácticos fueron mas bajos que los de *Listeria,* durante la acidificación en masa y prensado, el desarrollo de ambos mostró la misma tendencia y proporción, por lo que aparentemente las bacterias lácticas no influyeron en la inhibición de *L. monocytogenes* 1633, mas aún la prueba de Pearson reveló que en la etapa de prensado 8 h hubo una correlación significativa positiva ($p < 0.05$) entre *Listeria* y lácticos, por lo que un tercer factor pudo ocasionar directa o indirectamente el desarrollo de ambas variables.

La concentración de acidez obtenida en esta fase de nuestro estudio, al parecer no solo no afectó el desarrollo de *L. monocytogenes*, sino que como

lo indica la prueba de Pearson, durante la acidificación en masa a 20 h y cuajada en prensado 8 h hubo una correlación positiva significativa ($p< 0.05$) y una correlación positiva altamente significativa ($p <0.01$), respectivamente, entre *Listeria* y la acidez, indicando que ambos parámetros aumentaron simultáneamente (esto a pesar de que la acidez durante el prensado aumentó de 0.2 % a 0.46 % de ácido láctico). En, estudios donde si se observó inhibición (Shaack y Marth, 1988b), se desconoce si la inhibición de *L monocytogenes* se debió a la disminución del pH del medio causada por la producción de ácidos orgánicos o de substancias antimicrobianas. Pearson y Marth (1990), por su parte, mencionan que el 0.1 % de ácido acético, cítrico o láctico, inhiben el desarrollo de *L. monocytogenes* cepas CA y V7 y 0.3 % de los ácidos provocan su inactivación. En un estudio hecho por Ryser *et al.*, (1985), en queso cottage, la incapacidad de *L. monocytogenes* para crecer se debió aparentemente a la producción de ácido láctico y a la disminución del pH resultante.

La correlacion positiva significativa ($p <0.05$) entre *Listeria* y pH en la etapa de acidificado en masa 20 h, confirma que en general el pH no impidió el desarrollo de *Listeria*, sin embargo la correlacion significativa ($p <0.05$) negativa en prensado 8 h, parece indicar que al menos en esta etapa, la disminución del pH (aunque ligera) pudo influir en que los niveles de *Listeria* no fueran mas elevados de lo que se observó.

Cuando el queso Adobera fue almacenado en refrigeración (4 °C) durante 22 días, se obtuvo la tasa más alta de multiplicación de *L. monocytogenes* (3.5 log) (3,200 veces mas en relación con la leche pasteurizada recién inoculada), mostrando en esta etapa una proporción mayor a la obtenida durante su elaboración. La multiplicación de *L. monocytogenes,* ya sea durante el madurado o el almacenamiento, ha sido reportada también para los quesos Brick (Ryser y Marth, 1989b), Feta (Papageorgiou y Marth, 1989), Camembert (Ryser y Marth, 1989a) y Panela (Luis Juan *et al.*, 1995a). Como era de esperarse, la refrigeración permitió el

desarrollo del patógeno, mientras que los lácticos que al inicio aumentaron en mayor proporción, posteriormente mostraron un ligero incremento, y aparentemente no afectaron el desarrollo de *Listeria*. La acidez por su parte continuó incrementándose alcanzando su mayor nivel a 15 d de almacenamiento, donde se evidenció también una correlación negativa significativa ($p < 0.05$) entre *Listeria* y acidez, lo que pudo ser la causa de la ligera disminución en el nivel del patógeno a los 22 días del almacenamiento. Aunque el pH promedio en general solo disminuyó ligeramente durante el almacenamiento (de 5.79 a 5.21), los límites de pH de 4.81 a 6.35 observados en los experimentos, aunque relativamente amplios, se encuentran entre los que permiten el desarrollo y/o sobreviviencia de *Listeria* (Lovett, 1989b). Según el reporte de Papageorgiou y Marth (1989), *L monocytogenes* sobrevive en queso feta a 4 °C y a pH de 4.3, por más de 90 días. En queso Camembert el patógeno es capaz de desarrollar durante el almacenamiento a 6 °C a pH 7.4 (Ryser y Marth, 1989a).

En las investigaciones sobre la dinámica de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos es común utilizar cepas de referencia. Estudios recientes han demostrado que la cepa CA de *L. monocytogenes* fue menos tolerante que otras cepas de *L. monocytogenes* a las condiciones presentes durante la elaboración y almacenamiento de los quesos Brick (Ryser y Marth, 1989b), Feta (Papageorgiou y Marth, 1989), Cheddar (Ryser y Marth, 1987) y Colby (Yousef y Marth, 1988). En este estudio, con el fin de eliminar hasta donde fuera posible el efecto de la adaptación de la cepa a probar, utilizamos una cepa nativa (*L. monocytogenes* 1633) aislada de un queso Adobera de la región, por lo que se infiere que el patógeno se encontraba adaptado al substrato y que en lo que respecta a este factor no se afectó el desarrollo del microorganismo.

Si bien la sola presencia de *L. monocytogenes* en el queso Adobera es de especial interés, aún más lo es la capacidad mostrada en este estudio por el microorganismo para multiplicarse durante la fabricación y almacenamiento

4 ^{0}C hasta por 22 días, sobre todo por que este producto no recibe ningún tratamiento térmico o madurado posterior y es común que su consumo inicie inmediatamente después de su fabricación.

Los quesos Adobera, a pesar de ser elaborados a partir de leche pasteurizada, poseen un importante riesgo a la salud, sobre todo si se encuentran contaminados con *L. monocytogenes* (lo que es altamente factible dadas las múltiples posibilidades de contaminación del producto en todas las etapas, sobre todo en la propia planta) y porque en su fabricación y almacenamiento se dan las oportunidades para que el microorganismo se multiplique. Es imperativo que estos quesos sean elaborados bajo condiciones higiénicas y se detecten y eliminen las fuentes y mecanismos de contaminación con el patógeno en las plantas de lácteos.

La Asociación de Consumidores de la Comunidad Económica Europea publicó una lista de quesos blandos y semiblandos, y las marcas, fabricados en Francia y Suiza que incluyen; los quesos Brie (La Renommee), Muenster (Ermitage), Créme de bleu (Diapason), Lys Bleu, Camembert (I signi), Tilsit, Fourme de Bresse, Bleu de Bresse, Reblochon, Pont L´Eveque, Gruyere y Vacherin Mont d' Or, como quesos que no deben ser consumidos por individuos susceptibles (Ryser, 1999c). Así mismo, el Centro Para la Seguridad de Alimentos y Nutrición Aplicada de la FDA de los Estados Unidos, advierte a los consumidores de alto riesgo: No comer queso fresco como el Feta, Brie, Camembert, quesos de vena azul y quesos estilo Mexicano como "Queso Blanco Fresco" (FDA, 2001). Tomando en cuenta lo anterior, y con base en los resultados aquí obtenidos, proponemos que las autoridades sanitarias de nuestro país, estudien la posibilidad de recomendar a la población susceptible que evite el consumo de ciertas marcas de queso adobera.

Es necesario que se difunda un conocimiento actualizado de la enfermedad; entre médicos, veterinarios, tecnólogos, microbiólogos, epidemiólogos, productores y procesadores de alimentos. Además de esto se

requiere una mayor atención por parte de las autoridades sanitarias para la aplicación de las Buenas Prácticas de Manufactura, así como del Sistema de Análisis de Riesgos y Control de puntos Críticos en la industria de lácteos con el fin de obtener alimentos inocuos.

8. CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1. El queso adobera que se vende en tiendas de autoservicio de la ZMG, es un vehículo importante de *Listeria monocytogenes* para el consumidor, a pesar de estar elaborado con leche pasteurizada (según etiqueta del fabricante) y comercializado en sitios con recursos que permitirían un buen manejo higiénico del producto.

2. El Agar LPM resultó mas efectivo que el medio MOX en el aislamiento de *Listeria* a partir del queso adobera. Es necesario incubar 48 horas el CEL e intentar el aislamiento a los dos tiempos de incubación (24 y 48 horas).

3. El recuento de *Listeria* en los quesos positivos (hasta 3.7×10^5 ufc/g) es una mejor evidencia del riesgo potencial para el consumidor con respecto al diagnostico cualitativo del microorganismo.

4. En las condiciones de este estudio, la flora láctica, el pH y la acidez, no impidieron el desarrollo de *Listeria monocytogenes* 1633 durante la fabricación del queso adobera.

5. El almacenamiento del queso adobera por 22 días en refrigeración a 4 °C, permitió el desarrollo de *L. monocytogenes* 1633, estabilizó el nivel de lácticos, el pH y la acidez.

9. BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFIA

Anónimo. 1987. *Listeria monocytogenes.* A foodborne pathogen of renewed interest. A Newsletter from Silliker laboratories. Scope. II(1):1-2.

Armstrong, R.W., and P.C. Fung. 1993. Brainstem encephalitis (rhombenephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: case report and review. Clin. Infect. Dis. 16 :689-702

Baron, E.J. & S.M. Finegold. 1990. Bailey & Scott's. Diagnostic microbiology, 8th ed. the C.V. Mosby Co., St. Louis, Missouri., U.S.A. pp. 100-126.

Barriga Angulo, G., E. Romo Rodríguez, N. Ramírez Rodríguez y M.A. Peredo LópezVelarde. 1981. Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* (Informe de 5 Casos). Rev. Méd. IMSS (Mex). 19:519-525.

Batt, C.A., 1999. Rapid methods for detection of *Listeria. In*: E. T. Ryser and E. H. Marth, eds., *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 261-278.

Beckers, H.J., P.S. Soentero, and E.H.M. Delfgou-van Asch. 1987. The ocurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistence to heat. Int. J. Food Microbiol. 4:249-256.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1994. 9th ed. (Holt, J,G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T., eds.) Williams & Wilkins Co., Baltimore. p.556

Bille, J., and M.P. Doyle. 1991. *Listeria* and *Erysipelothrix*. *In*: Manual of clinical microbiology. A. Balows, W.J. Hausler, Jr., H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy. 5th Edition, ed. American Society of Microbiology, Washington, D.C. pp. 287-295.

Boggs, J.D., R.E. Witman, L.M. Hale, R.P. Briscoe and S.E. kahn. 2001. Outbreak of Listeriosis Associated with homemade Mexican-Style Cheese-North Carolina-January 2001. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 50:560-562.

Bowmer, E.J., R.H. Conklin, and J.H. Seele. 1979. Listeriosis. *In*: Handbook Series in Zoonosis. Section A.1., J.H. Steele, ed. CRC Press. Boca Raton, Florida. pp. 423-445.

Brackett, R.E. 1988. Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. Food Technol. 42:162-164,178.

Bradley, R. L., E. Arnold, D. M. Barbano, R. G. Semerad, D. E. Smith and B. K. Vines. 1992. Chemical and physical methods. In: Standard Methods for the examination of dairy products. 16 th Ed. (R. T. Marsall, Ed.), American Public Health Association, Washington, D. C. pp. 435-437.

Breer, C., and K. Schopfer. 1989. *Listerien* in Nahrungsmitteln. Schweiz. Med. Wochenschr. 199:306-311.

Buazzi, M.M., M.E. Johnson, and E.H. Marth. 1992. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of mozzarella cheese. J. Food Prot. 55:80-83.

Buchanan, R.L., H.G. Stahl, and D.L. Archer. 1987. Improved plating media for simplified, qualitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Food Microbiology. 4:269-275.

CDC. 1988. Update-Listeriosis and Pasteurized Milk. Morbid. Mortal. Weekly Rep. 37:764-765.

CDC. 1992. Update: Foodborne Listeriosis- United States, 1988-1990. Morbid. Mortal. Weekly Rep.41:251-258.

Covarrubias Godinez, L.E., A. Luisjuan Morales, R. Alaniz de la O y E. Martinez Bravo. 1999. Frecuencia y cuantificación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos. XVI Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los alimentos y Primer Congreso internacional en seguridad de alimentos. Guadalajara, Jal., Mex. pag. 49.

Cotton, L.N., and C.H. White. 1992. *Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica,* and *Salmonella* in dairy plants environments. J. Dairy Sci. 75:51-57.

Cox, L.J. 1989a. A perspective on listeriosis. Food Technol. 43:52-59.

Cox, L.J., T. Kleiss, J.L. Cordier, C. Cordellana, P. Kondel, C. Padrazzini, R. Beumer, and A. Siebenga. 1989b. *Listeria spp.* in food processing, non-food and domestic environments. Food Microbiol. 6:49-61.

Da Silva, M.C., E. Hofer and A. Tibana. 1998. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese produced in Rio de Janeiro, Brazil. Journal of Food Protection. 61 (3):354-356.

Davidson, R.J., D.W. Sprung, C.E. Park, and M.K. Rayman. 1989. Occurrence of *Listeria monocytogenes, Campylobacter spp,* and *Yersinia enterolitica* in Manitoba raw milk. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 22:70-74.

Davidson, C.M., and F. Cronin. 1973. Medium for the selective enumeration of lactic acid bacteria from foods. Appl. Microbiol. 26:439-440.

Domínguez-Rodríguez, L., J.F. Fernández-Garayzabal, J.A. Vázquez-Boland, E. Rodríguez-Ferri et G. Suárez-Fernández. 1985. Insolations de microorganismes du genre *Listeria* à partir de lait cru destiné à la consommation humanie. Can, J. Microbiol. 31:938-941.

Donnely, C. W. 1999. Conventional methods to detect and isolate *Listeria monocytogenes*. *In*: E.T. Ryser and E.H. Marth, eds., *Listeria,* Listeriosis, and food safety, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 225-260.

Doyle P.M., and J.L. Schoeni. 1987a. Comparison of procedures for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surfaces-ripened cheese. J. Food Prot. 50:4-6.

Doyle, P.M., K.A. Glase, J.T. Beery, G.A. García, D.J. Pollard, and R.D. Schults. 1987b. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high temperature, short time pasteurization. Appl. environ. Microbiol. 53:1433-1438.

Doyle, M.P. 1988. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. Food Technol. 42:169-171

Doyle, M. P. 1994. The emergence of new agents of fooborne disease in the 1980s. Food Res. Int. 27:219-226.

Eilertz, I., M.-L. Danielsson-Tham, K.-E. Hammarberg, M.W. Reeves, J. Rocourt, H. P. R. Seeliger, B. Swaminathan, and W. Tham. 1993. Isolation of

Listeria monocytogenes from goat cheese associated with a case of listeriosis in goat. Acta Vet. Scand. 34:145-149.

Facinelli, B., E. Giovanetti, P.E. Varaldo, P. Casolari, and U. Fabio. 1991. Antibiotic resistance in foodborne *Listeria*. Lancet. 338:1272.

Farber, J.M., G.W. Sanders, and S.A. Malcolm. 1988. The presence of *Listeria spp.* in raw milk in Ontario. Can. J. Microbiol. 34:95-100.

Farber, J.M., G.W. Sanders, and M.A. Johnston. 1989. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. J. Food Prot. 52:456-458.

Farber, J.M, and P.I. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. Microbiol. Rev. 55:476-511.

FDA. 1988. Bacteriological Analytical Manual, Chapter 29- *Listeria* isolation; revised method of analysis: notice. Fed. Regist. 53:44147-44153.

FDA. Center for safety and Applied Nutrition. 2001. How to safely handle refrigerated ready-to-eat foods and avoid Listeriosis. Consumer Advisory. www.cfsam.fda.gov/~dms/adlister.html. Acceso el 12/05/2001.

Fenlon, D.R., and J. Wilson. 1989. The incidence of *Listeria monocytogenes* un raw milk from farm bulk tanks in North-East Scotland. Journal of Applied Bacteriology. 66:191-196.

Fernández Escartín, E. 1981. Microbiología Sanitaria. pp. 109-156. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, México.

Fernández Escartín, E., A. Castillo Ayala y R. Torres Vitela. 1982. Destino de *Salmonella* artificialmente inoculada en la leche durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos no pasteurizados. I. Cambios en el pH, acidez y flora microbiana. Rev. Lat-amer. Microbiol. 24:235-240.

Fernández Escartín, E., A. Castillo Ayala y R. Torres Vitela, 1983. Destino de *Staphylococcus aureus* nativo y de *Salmonella* artificialmente inoculada en la leche durante la elaboración y almacenamiento de quesos frescos no pasteurizados. II. Influencia del pH, de la flora asociada y del nivel original de la contaminación del patógeno. Rev. Lat-amer. Microbiol. 25:263-269.

Fernández Escartín, E., A. Castillo Ayala y R. Torres Vitela, 1984. Antagonismo de cepas de *Streptococcus, Lactobacillus y Leuconostoc* procedentes de quesos no pasteurizados contra algunas bacterias patógenas. Rev. Lat-amer. Microbiol. 26:47-51.

Fernández Garayzabal, J.F., L. Domínguez Rodríguez, J.A. Vázquez Boland, J.L. Blanco Concelo et G. Suárez Fernández. 1986. *Listeria monocytogenes* dans le laits pasteurisé. Can. J. Microbiol. 32:149-150.

Fernández Garabyzabal, J.F., L. Domínguez, J.A. Vázquez, E. Gómez-Lucia, E.R. Rodríguez Ferri, and G. Suárez. 1987. Ocurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk. Vet. Rec. 120:258-259.

Fleming, D.W., S.L. Cochi, K.L. MacDonald, J. Brondum, P.S. Hayes, B.D. Plikaytis, M.B. Holmes, A. Audurier, C.V. Broome, and A.L. Reingold. 1985. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N. Engl. J. Med. 312:404-407.

Galindo, R. V., R. E. Fernández y M. R. Rodríguez. 1996. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en queso fresco con marca comercial y de elaboración casera. XIII reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los alimentos. Guadalajara, Jal., Mex. pag.

García de Alba, G. J. E. 1995. Estadística para el equipo del area de salud. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal. México.

Garzaroli, C., and G. Rondinini. 1992. Study on cuantitative determination of *Listeria spp.* In dairy products. Lebensmittel-Vissenchaft & technologie. 25: 158-161.

Gellin, B.C., and C.V. Broome. 1989. Listeriosis. J. Am. Med. Assoc. 261:1313-1320.

Gellin, B.C., C.V. Broome, W.F. Bibb, R.E. Weaver, S. Gaventa, L. Mascola, and The Listeriosis Study Group. 1991. The epidemiology of listeriosis in the United States -1986. Am. J. Epidemiol. 133:392-401.

Genigeorgis, C., J.H. Toledo, and J. Fernández Garayzabal. 1991. Selected microbiological and chemical characteristics of illegally produced and marketed soft hispanic-style cheeses in California. J. Food Prot. 54:598-601.

Gilbert, R. J., J. Mclauchlin, and S. K. Velani. 1993. The contamination of paté by *Listeria monocytogenes* in England and Wales in 1989 and 1990. Epidemiol. Infect. 110:543-551.

Giono-Cerezo, S., y A. Pérez-Miravete. 1963. La infección listérica en México: III. Titulación de anticuerpos anti-*Listeria* en mujeres embarazadas y no embarazadas. Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop. (Méx). XXIII (1-2):115-119.

Greenwood, M.H., D. Roberts, and P. Burden. 1991. The ocurrence of *Listeria* species en milk and diary products: a national survey in England and Wales. Int. J. Food Microbiol. 12:197-206.

Guyer, S., and T. Jemmi. 1991. Behavior of *Listeria monocytogenes* during fabrication and storage of experimentally contaminated smoked salmon. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1523-1527.

Hayes, P.S., J.C. Feeley, L.M. Graves, G.W. Ajello, and D.W. Fleming. 1986. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. Appl. Environ. Microbiol. 51:438-440.

Hird, D.W. 1987. Review of evidence for zoonotic listeriosis. J. Food Prot. 50:429-433.

Hitchins, A.D. 1995., *Listeria monocytogenes*. In: FDA Bacteriological Analytical Manual, 8th ed. AOAC, international, Gaithersburg, M D, pp 10.01-10.13.

Ho, J.L., K.N. Shands, G. Friedland, P. Eckind, and D.W. Fraser. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* Infection Involving Patients from Eight Boston Hospitals. Arch. Intern. Med. 146:520-524.

James S.M., S.L. Fannin, B.A. Agee, B. Hall, E. Parker, J. Vogt, G. Run, J. Williams, L. Lieb, C. Salminen, T. Prendergast, S.B. Werner, and J. Chin. 1985. Listeriosis outbreak associated with Mexican-Style-Cheese-California. Morbid Mortal. Weekly Rep. 34:357-359.

Jeong, D.K., and J. F. Frank. 1994. Growth of *Listeria monocytogenes* at 10 C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. J. Food Prot. 57 (7):576-586.

Jones, D. 1990. Foodborne listeriosis. Lancet. 336:1171-1174.

Keer, K., S.F. Dealler, and R.W. Lacey. 1988. *Listeria* in cook-chill food. Lancet ii:37-38.

Klausner, R.B., and C.W. Donnely. 1991. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont Dairy Plants. J. Food Prot. 54:607-611.

Larsson, S., M.H. Walder, S.N. Cronberg, A.B. Forsgren and T. Moestrup. 1985. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from 1958 to 1982 in Sweden. Antimicrob. Agents Chemother. 28 (1): 13.

Lichtenberg, F.V. 1987. Enfermedades causadas por virus, rickettsias y bacterias. pp. 327.en: Patología estructural y funcional. S.L. Robbins, R.S., Cotran y V. Kumar. 3a. Edición, ed. Nueva Editorial Interamericana, México, D.F.

Liewen, M.B., and M.W. Plautz. 1988. Ocurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. J. Food Prot. 51:840-841.

Linnan, M.J., L. Mascola, X.D. Lou, V. Goulet, S. May, C. Salminen, D.W. Hird, M.L: Yonekuara, P. Hayes, R. Weaver, A. Audrier, B.D. Pilkaytis, S. L. Fannin, A. Kleks and C.V. Broome. 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. N. Engl. J. Med. 319: 823-828.

Lou, Y. and A.E. Yousef. 1999. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors, p. 131-224. In E.T. Ryser and E.H. Marth (ed.), *Listeria*, Listeriosis and Food safety. 2d. ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Lovett, J., D.W. Francis, and J.M. Hunt. 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk: detection, incidence, and pathogenicity. J. Food Prot. 50:188-192.

Lovett, J., and A.D. Hitchins. 1989a. *Listeria* Isolation. p. 29.09, in: Bacteriological analytical manual. 6th Edition, Supplement. U.S. Food and Drug Administration, ed. AOAC., Arlington, Virginia.

Lovett, J. 1989b. *Listeria monocytogenes*. pp. 283-310. In: Foodborne bacterial pathogens. M.P. Doyle, ed. Marcel Dekker, Inc. New York.

Luis Juan, M.A., R. Alaniz-de la O y M.E. Vázquez S. 1992a. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco tipo panela que se expende en mercados de Guadalajara, Jal. XXIII Congreso Nal. Microbiol., Jun. 15-18, Acapulco, Gro, México.

Luis Juan M.A., M.E. Vázquez S. y R. Alaniz- de la O. 1992b. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco tipo ranchero que se expende en mercados de Guadalajara, Jal. IX Reunión Anual Microbiol. Hig. y Tox. Alim., Nov. 6-7, Guadalajara, Jal, México.

Luis Juan Morales A., R. Alaniz de la O, Vázquez Sandoval M.E., Rios Ibarra, M.L. y Rosas Barbosa, B.T. 1995a. Dinámica de *Listeria monocytogenes* y cambios concurrentes en la flora asociada, pH y acidez durante la elaboración y almacenamiento de queso panela. Memorias de la VIII Reunión de Avances en Investigaciones Pecuarias. Aguascalientes, México., pp 29-31.

Luisjuan-Morales, A., R. Alaniz de la O, M. E. Vázquez Sandoval y B.T. Rosas Barbosa.1995b. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara Mexico. J. of Food Prot. 58:1139-1141.

Luis Juan Morales, A., M. Hernández Suárez, R. Alaniz de la O y B. T. Rosas Barbosa. 1999. *Listeria monocytogenes* y otros parámetros de calidad en requesón comercial. XVI Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos y Primer Congreso Internacional en Seguridad de Alimentos. Guadalajara, Jal. Mex. pag. 11.

MacFaddin, J.F. 1980. Biochemical tests for Identification of Medical Bacteria. 2nd Edition. Ed. Williams & Wilkins, Baltimore/London.

MacGowan, A.P., D.S. Reeves, and J. McLauchlin. 1990. Antibiotic Resistance of *Listeria monocytogenes*. Lancet. 336:513-514.

Marth, E.H. 1988. Disease characteristics of *Listeria monocytogenes*. Food Technol. 42:165-168.

Massa, S., D. Cesaroni, G. Poda, and L.D. Trovatelli. 1990. The incidence of *Listeria spp.* in soft cheeses, butter and raw milk in the province of Bologna. J. Appl. Bacteriol. 68:153-156.

McLauchlin, J. 1987. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. J. Appl. Bacteriol. 63:1-11.

McLauchlin, J., M.H. Greenwood, and P.N. Pini. 1990. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. Int. J. Food Microbiol. 10:255-262.

Medallion Laboratories. 1987. Food microbiology. Examining the greater risk. Analytical Progress. 4:1-8.

Microba-V. 1992. *Listeria monocytogenes* in food. Vet-Med-Praha. 36:745-750.

Nolla-Salas, J., J.M. Antó, M. Almela, P. Coll, I. Gasser, A. Plascencia, and the Collaborative Study Group of Listeriosis of Barcelona. 1993. Incidence of listeriosis in Barcelona, Spain, in 1990. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12:157-161.

OMS Groupe de Travail. 1989. Les Listériosis d'origine alimentaire. Bull. OMS. 67:19-26.

Palumbo, S.A. 1986. Is refrigeration enough to restrain foodborne pathogens?. J. Food Prot. 49:1003-1009.

Papageorgiou, D.K., and E.H. Marth. 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture, ripening and storage of feta cheese. J. Food Prot. 52:82-87.

Patterson, R.L., D.J. Push, and E.A. Zottola. 1989. The isolation and identification of *Listeria* species from raw milk. J. Food Prot. 52:745.

Parrilla-Cerrillo, M.C., J.L. Vazquez-Castellanos, E.O. Saldate-Castañeda y L.M. Nava-Fernandez. 1993. Brotes de toxiinfecciones alimentarias de origen microbiano y parasitario. Salud Pública Méx. 35 (5):456-463.

Pearson, L.J., and E.H. Marth. 1990. *Listeria monocytogenes* -Threat to a safe food supply: A Review. J. Dairy Sci. 73:912-928.

Piccinin, D. M., and L. A. Shelef. 1995. Survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. J. Food Prot. 58:128-131.

Pini, P.N., and R.J. Gilbert. 1988. The ocurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. Int. J. Food Microbiol. 6:317-326.

Poyart-Salmeron, C., C. Carlier, P. Trieu-Cuot, A.L. Courtieu, and P. Courvalin. 1990. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Lancet. 335:1422-1426.

Quentin C., M.C. Thibaut, J. Horovitz, and C. Bebear. 1990. Multiresistant strain of *Listeria monocytogenes* in septic abortion. Lancet. 336:375.

Ritchie, A.C. 1990. Listerial infections. pp. 346-347. In: Boyd's textbook of pathology. Vol. 1, Ninth Edition, ed. Lea & Febiger.

Roch, E., y G. Varela. 1963. Influencia de la listeriosis en la mortinatalidad en la Ciudad de México. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. Méx. 23(3 y 4):126-129.

Rocourt, J., U. Wehmeyer and E. Stackebrandt. 1987. Transfer of *Listeria denitrificans* to new genus. *Jonesia* gen. nov., as *Jonesia denitrificans* comb. nov. Inst. J. Syst. Bacteriol. 37:266-270.

Rocourt, J., P. Boerlin, F., Grimont, Ch. Jacquet, and J.-C. Piffaretti. 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a reviser description of *Listeria grayi*. Int. J. Syst Bacteriol. 42:69-73.

Rocourt, J. and P. Cossart. 1997. *Listeria monocytogenes*, p. 337-352. In : M.P. Doyle, L.R. Beuchat and T.J. Montville (eds.), Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. ASM Press. Washington, D.C.

Rocourt, J. 1999. The Genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic Position, Taxonomy, and Identification. *In*: E.T. Ryser and E.H. Marth, eds., *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp.1-20.

Rodler, M., and W. Körbler. 1989. Examination of *Listeria monocytogenes* in milk products. Acta Microbiol. Hung, 36:259-261.

Rohrbach, B.W., F.A. Draughon, P.M. Davidson, and S.P. Oliver. 1992. Prevalence of *Listeria monocytogenes, Campylobacter jejuni, Yersinia enterocolítica,* and *Salmonella* in bulk tank milk: Risk factors and risk of human exposure. J. Food Prot. 55:93-97.

Rosenow, E.M., and E.H. Marth. 1987. Growth of *Listeria monocytigenes* in skim, whole and chocolate milk and in whipping cream during incubation at 4, 8, 13, 21 and 35°C. J. Food Prot. 50:452-459.

Ryser, E.T., E.H. Marth, and M.P. Doyle. 1985. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. J. Food Prot. 48:746-750.

Ryser, E.T., and E.H. Marth. 1987. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of cheddar cheese. J. Food Prot. 50:7-13.

Ryser, E.T., and E.H. Marth. 1989a. Fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of camembert cheese. J. Food. Prot. 50:372-378.

Ryser, E.T., and E.H. Marth. 1989b. Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of brick cheese. J. Dairy Sci. 72:838-853.

Ryser, E.T. and E.H. Marth. 1991. Characteristics and Classification. *In*: E.T. Ryser and E. H. Marth, eds., *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 1-21.

Ryser, E.T. 1999a. Foodborne Listeriosis. *In*: E.T. Ryser and E. H. Marth, eds., *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 299-358.

Ryser, E.T. 1999b. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products. *In*: E.T. Ryser and E. H. Marth, eds., *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 359-409.

Ryser, E.T. 1999c. Incidence and Behavior of *Listeria monocytogenes* in cheese and other fermented dairy products. *In*: E.T. Ryser and E. H. Marth, eds., *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety, 2nd ed., Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 411-503.

Schaack, M.M., and E.H. Marth. 1988a. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk during fermentation with mesophilic lactic starter cultures. J. Food Prot. 51:600-606.

Schaack, M.M., and E.H. Marth. 1988b. Behavior of *Listeria monocytogenes* in skim milk and in yogurt mix during fermentation by thermophilic lactic acid bacteria. J.Food Prot. 51:607-614.

Schaack, M.M., and E.H. Marth. 1988c. Survival of *Listeria monocytogenes* in refrigerated cultured milks and yogurt. J. Food Prot. 51:848-852.

Schlech, W.F., P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, and C.V. Broome. 1983. Epidemic listeriosis-evidence for transmission by food. N. Engl. J. Med. 308:203-206.

Schlech, W.F. 1989. Methods to determine the virulence of *Listeria* strains. Int. J. Food Microbiol. 8:273-276.

Schlech III, W.F. 1992. Expanding the horizons of foodborne listeriosis. J.A.M.A. 267:2081-2182.

Schuchat, A., B. Swaminathan, and C.V. Broome. 1991. Epidemiology of human listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 4:169-183.

Schwartz, B., D. Hexter, C.V. Broome, A.W. Hightower, R.B. Hirshhorn, J.D. Porter, P.S. Hayes, W.F. Bibbs, B. Lorber, and D.G. Faris. 1989. Investigation of an outbreak of listeriosis: new hypotheses for the etiology of epidemic *Listeria monocytogenes*. J. Infect. Dis. 159:680-685.

Secretaría de Salud. 1994. Norma Oficial Mexicana NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Diario Oficial de la Federación.

Secretatía de Salud. 1999. Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios. Cap. II. Leche. Artículo 41. Diario Oficial de la Federación. 9, agosto.

Seeliger, H.P.R., and D. Jones. 1986. Genus *Listeria* Pirie, 1940, 383^{AL}, pp. 1235-1245. In: Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology, Vol. 2. P.H.A. Sneath, H.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt, ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Seeliger, H.P.R. 1988. *Listeria* - History and actual developments. Infection 16 (suppl. 2): S80-S84.

Sharif, A., and N. Tunail. 1991. *Listeria monocytogenes* contamination of raw milk from different regions of Anatolia and pasteurized milk sold in Ankara. Mikrobiyol-Bul. 25:15-20.

Skovgaard, N., and C.A. Morgen. 1988. Detection of *Listeria spp* in faeces from animals, in feeds and raw foods of animal origen. Int. J. Food Microbiol. 6:229-242.

Slade, P.J., and D.L. Collins-Thompson. 1990. *Listeria* plasmids, antibiotic resistance and food. Lancet. 336:1004.

Smith, J.L., and R.L. Buchanan. 1990. Identification of supplements that enhance the recovery of *Listeria monocytogenes* on modified Vogel Johnson agar. J. of Food Safety. 10:155-163.

Solórzano-Santos, F., J.L. Arredondo-García, E. Udaeta-Mora y col. 1989. Infección sistémica neonatal por *Listeria monocytogenes*. Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx. 46:709-714.

Southwick, F.S. and D. L. Purich. 1996. Mechanisms of Disease : Intracellular Pathogenesis of Listeriosis. N.Engl.J.Med.334(12) :770-776

Stone, D.L. 1987. A survey of raw whole milk for *Campylobacter jejuni, Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterolitica*. N Z J. Dairy Sci. Technol. 22:257-264.

Tappero, J.W., A. Schuchat, K.A. Deaver, L. Mascola, J.D. Wenger. 1995. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States : Effectiveness of prevention efforts ? J.A.M.A. 273 :1118-1122

Tham, W.A., and V.M.L. Danielsson-Tham. 1988. *Listeria monocytogenes* isolated from soft chesse. Vet. Rec. 122:539-540.

The National Advisory Commitee on Microbiological Criteria for Foods. 1991. *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 14:185-246.

Varela, G., G. Schnaas, y J. Gómez. 1959. Hallazgo de *Listeria monocytogenes*. Rev. Inst. Salubr. Enf. Trop. (Méx). 19:251-253.

Vázquez-Salinas, C., O. Rodas-Suárez y E. I. Quiñones Ramírez. 2001. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. Food Microbiol.18 :177-181.

Venables, L.J. 1989. *Listeria monocytogenes* in dairy products- The Victorian experience. Food Aust. 41:942-943.

Victoria, R.V., V. Vanzzini y A. Pérez-Miravete. 1967. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* relacionado con aborto y muerte perinatal en la ciudad de Puebla. Rev. Inv. Sal. Pub. Méx.XXVII (2):129-136.

Vizcaíno Forcada, L. y M. Mustre de León. 1992. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos. IX Reunión Anual de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos (Resumen). Guadalajara, Méx.

Villegas de Gante, A. 1993. Los quesos mexicanos. CIESTAAM. Universidad Autónoma de Chapingo. Edo. de Méx. México.

Warburton, D.W., J.M. Farber, A. Armstrong, R. Caldeira, T. Hunt, S. Messier, R. Plante, N.P. Tiwari, and J. Vinet. 1991a. A comparative study of the FDA and USDA methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Int. J. Food Microbiol. 13:105-117.

Weagant S.D., P.N. Sado, K.G. Colburn, J.D. Torkelson,F.A. Stanley, M.H. Krane, S.C. Shields, and C.F. Thayer. 1988. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. J. Food. Prot. 51:655-657.

Westoo, A., and M. Peterz. 1992. Evaluation of methods for detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Journal of AOAC International. 75 (1): 46-52.

Wher, H.M. 1987. *Listeria monocytogenes* -A current dilemma. J. Assoc. Off Anal. Chem. 70:769.

Wong, H-C., W.L. Chao., and S-J. Lee. 1990. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. Appl. Environ. Microbiol. 56:3101-3104.

Yousef, A.E., and E.H. Marth. 1988. Behavior of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of colby cheese. J. Food Prot. 51:12-15.

Zar, J. H. 1999. Biostatistical Analysis, 4th ed., Prentice Hall, New Jersey.

10. ANEXO

10. ANEXO

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

a) Caldo de Enriquecimiento *Listeria* (CEL).

Caldo soya tripticasa..... 30 g
Extracto de levadura ..... 6 g
Acriflavina-HCl ..... 15 mg
Acido nalidíxico ..... 40 mg
Cicloheximida ..... 50 mg
Agua destilada ..... 1000 ml
pH final 7.3 $\pm$ 0.2

Preparar soluciones stock de acriflavina, ac. nalidíxico y cicloheximida. La acriflavina se prepara al 0.5 % en agua destilada, el ac. nalidíxico se disuelve al 0.5 % en una solución de NaOH al 0.1 N al 50 % en agua destilada, la cicloheximida se prepara al 1 % en una solución al 40 % de etanol/agua. Los tres inhibidores se esterilizan por filtración. Adicionar asépticamente a 225 ml de CEL esterilizado (121 °C por 15 minutos) 0.68 ml de solución stock de acriflavina, 1.8 ml de solución de ac. nalidíxico y 1.15 ml de la solución de cicloheximida, justo antes de su uso.

b) Agar Cloruro de Litio-Feniletanol-Moxalactam (LPM).

Agar fenil-etanol-(BBL).....35.5 g
Glicina anhidra ..... .10.0 g
Cloruro de litio ..... 5.0 g
Solución Stock de moxalactam al 1% ..... 2.0 ml
Agua destilada ..... 1000 ml
pH final 7.3 $\pm$ 0.2

Esterilizar el medio sin moxalactam a 121 °C por 12 minutos. Adicionar al medio enfriado a 46 °C, la solución *stock* del antibiótico previamente esterilizada por filtración.

La solución stock de moxalactam se prepara con 1 g de la sal en 100 ml de buffer de fosfato de potasio 0.1 M de pH 6.0. Es recomendable transferir la solución a tubos con 2 ml cada uno y almacenarlos en congelación.

Cuando se utiliza agar fenil-etanol de la marca BBL es necesario adicionar 2 g de agar bacteriológico, por litro de medio para lograr la consistencia adecuada.

c) Medio de Oxford Modificado (MOX).

Base de agar Columbia ..... 39 g
Esculina.....1 g
Citrato ferrico amonico.....0.5 g
Cloruro de litio.....15 g
Agar bacteriológico.....2 g
Moxalactam.....20 mg
Colistina.....8 mg
Agua destilada ..... 1000 ml
pH final: 7.0 $\pm$ 0.2

Esterilizar el medio sin los antibióticos a 121 °C durante 15 minutos. Al medio esterilizado y enfriado a 46 °C, adicionar las soluciones de antibiótico esterilizadas por filtración: 2 mililitros de la solución stock de moxalactam al 1.0 % (la misma empleada en el LPM) y 1.6 ml de la solución de colistina al 0.5 % en agua destilada (ambas soluciones se esterilizan por filtración) después de su esterilización. Almacenar a 4 °C $\pm$ 2 en la oscuridad por una semana.

d) Agar Soya Tripticasa con Extracto de Levadura (ASTEL)

Agar Soya Tripticasa ..... 40 g
Extracto de levadura ..... 6 g
Agua destilada ..... 1000 ml
Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.
pH final 7.3 $\pm$ 0.2

e) Caldo Soya Tripticasa con Extracto de levadura (CSTEL)

Caldo Soya Tripticasa ..... 30 g

Extracto de levadura ..... 6 g

Agua destilada ..... 1000 ml

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

f) Agar Sangre de Ovino (ASO)

ASTEL ..... 93.0 ml

Sangre desfibrinada de ovino .... 7.0 ml

La sangre es adicionada al ASTEL cuando el medio está entre 45 y 46 °C después de su esterilización.

g) Agar Base Púrpura para Fermentación de Carbohidratos (BPFC).

Agar bacteriológico..... ..... 13.5 g

Peptona de gelatina ..... 10.0 g

NaCl ..... 5.0 g

Púrpura de bromocresol* .....0.02 g

Agua destilada ..... 1000 ml

Ajustar el pH antes de adicionar el indicador a 6.8 $\pm$ 0.2. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

* Se prepara una solución *stock* de púrpura de bromocresol (PB) al 1 %, pesando 0.1 g de PB, triturar en mortero adicionando 1.85 ml de NaOH 1 N con 8.15 ml de agua destilada.

Se adiciona 1 ml de la solución al 5 % del carbohidrato a probar (esterilizada por filtración), a 9 ml de BPFC estéril, para obtener una concentración final del carbohidrato de 0.5 %. La esculina se prepara también en solución al 5 % y se adiciona al BPFC antes de la esterilización del medio.

h) Agar Vogel Johnson Modificado (VJM).

	Cantidad recomendada (Buchanan *et al.*, 1987)	usada en este estudio
Agar Vogel Johnson (Difco)	60 g	60 g
Ac. nalidíxico*	50 mg	25 mg
Bacitracina*	20 mg	10 mg
Moxalactam*	5 mg	2.5 mg
Telurito de potasio *	200 mg	200 mg
Tween 80 (123)	4 g	4 g
Agua destilada	980 ml	980 ml

* El ac. Nalidíxico al 0.5 %, la bacitracina al 0.2 %, el moxalactam al 0.05 % y el telurito de potasio al 2 %, se adicionaron como soluciones *stock* esterilizadas por filtración, después de que el medio se esterilizó a 121 °C por 15 minutos y se enfrió a 50 °C.

i) Medio Actidiona Polimixina Nitrito (APN).

Peptona de Evans ..... 10.0 g
Peptona de caseína ..... 10.0 g
Extracto de levadura ..... 10.0 g
Glucosa ..... 7.5 g
Extracto de carne ..... 2.5 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ..... 0.575 g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ..... 0.05 g
Tween 80. ..... 1.0 g
Agar ..... 15.0 g
Agua destilada, pH 5.5, c.b.p..... 970 ml
*Nitrito de sodio ..... 0.6 g
*Actidiona (cicloheximida) ..... 0.01 g
*Sulfato de polimixina ..... 0.003 g

Los ingredientes se disolvieron por calentamiento, después de enfriar el medio a aproximadamente 50 °C se ajustó cuidadosamente el pH hasta 5.5 (± 0.05) y se completó el volumen a 970 ml. El medio se distribuyó en cantidades de 97 ml y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos.

* Antes de su uso, 1 ml de cada una de las siguientes soluciones esterilizadas por filtración: a) solución de nitrito de sodio recién preparada (6 % peso/vol); b) solución de actidiona (0.1 % peso/vol.) y c) solución de polimixina B (0.03 peso/vol) fueron adicionadas a cada 97 ml del medio base.

j) Buffer de fosfato de potasio 0.1M

Fosfato de potasio.....1.36 g

Agua destilada.....100 ml

Disolver el fosfato de potasio en el agua, ajustar el pH a 6.0 y esterilizar por 15 minutos a 121 °C.