

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

**CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE CIENCIAS VETERINARIAS
POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS PECUARIAS**



FUENTES Y MECANISMOS DE CONTAMINACIÓN CON *Listeria* DURANTE LA ELABORACIÓN ARTESANAL DE QUESOS FRESCOS.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :
MAESTRO EN CIENCIAS PECUARIAS
P R E S E N T A :
MVZ. BEATRIZ TERESA ROSAS BARBOSA
D I R E C T O R :
DRA. ANGÉLICA LUIS JUAN MORALES
A S E S O R E S :
DR. RICARDO ALANIZ DE LA O
DR. AGUSTIN RAMÍREZ ÁLVAREZ
LAS AGUJAS, NEXTIPAC, ZAPOPAN, JAL. FEBRERO DE 2003



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISION DE CIENCIAS VETERINARIAS

COORDINACIÓN DE POSGRADO



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

Por este conducto nos permitimos enviar la VERSION FINAL DE LA TESIS que desarrolló la pasante de Maestría en el Posgrado en Ciencias Pecuarías de la Universidad de Guadalajara, **M.V.Z. Beatriz Teresa Rosas Barbosa**, cuyo título es:

"Fuentes y mecanismos de contaminación con *Listeria* durante la elaboración artesanal de quesos frescos"

Trabajo dirigido por: **Dra. Angélica Luis Juan Morales**.

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 29 Noviembre del 2002

REVISOR

Dr. Efrain Pérez Torres

REVISOR

Dr. Hugo Castañeda Vázquez

REVISOR

Dra. Angélica Luis Juan Morales

REVISOR

Dr. Ma. Del Refugio Torres Vitela

REVISOR

Dr. Daniel A F Villagomez Zavala

c.c.p. Archivo

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE CUADROS	vi
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN	
ANTECEDENTES	
Listeriosis humana	2
Agente causal	2
Formas de infección	2
Período de incubación	2
Fisiopatología de la listeriosis.....	3
Principales cuadros clínicos	3
Infección durante el embarazo	5
Granulomatosis infantiséptica	5
Septicemia	5
Infección del sistema nervioso	6
Listeriosis cutánea	6
Enfermedad gastrointestinal febril	7
Diagnóstico	7
Tratamiento	7
Pronóstico	9
Aspectos Epidemiológicos	9
Reportes de listeriosis en México	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
Impacto económico y social de la listeriosis	15
Consecuencias de la presencia de	
<i>L.monocytogenes</i> en fábricas de alimentos	11
Frecuencia de <i>Listeria</i> en quesos	17
Importancia de los quesos blandos como	
vehículo de <i>L. monocytogenes</i>	18
Producción de quesos blandos en México	18
Producción artesanal de quesos en Jalisco	18
JUSTIFICACIÓN	20
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22

Continúa...

II. METODOLOGÍA	
Selección de las queserías artesanales	24
Período de muestreo y muestras recolectadas	24
Análisis microbiológico de las muestras	28
III. RESULTADOS	
Globales.....	37
Especies aisladas y productividad de los medios de aislamiento.....	39
Ciclo de producción y prácticas observadas en queserías	41
Quesería A	43
Quesería B	45
Quesería C	45
Quesería D	45
Caracterización molecular de aislamientos de <i>Listeria monocytogenes</i> procedentes de las queserías A y C	49
IV. DISCUSIÓN	
Fuentes y mecanismos de contaminación	54
Fuentes de contaminación con <i>Listeria</i> en fábricas de alimentos	54
Ingredientes.....	55
Piso y Enseres de limpieza.....	61
Equipo	62
Superficies	66
Modelo de contaminación de los quesos durante su elaboración artesanal.....	70
Persistencia de especies y serotipos de <i>Listeria</i>	71
Patrones de DNA en aislamientos de <i>Listeria monocytogenes</i>	73
<i>Listeria innocua</i>	75
Posible punto crítico de control	76
V. CONCLUSIONES.....	78
VI. LITERATURA CITADA	81
ANEXO	97

AGRADECIMIENTOS

Gracias a la Vida que me ha dado tanto.
Violeta Parra

Lo mejor de este trabajo fue posible gracias a la participación de las personas que me apoyaron en las distintas etapas que lo conformaron, por ello, agradezco infinitamente la colaboración desinteresada de:

DRA. Angélica Luis Juan Morales, DR. Ricardo Alaniz de la O y DR. Agustín Ramírez Álvarez, quienes en su calidad de cuerpo tutorial, se involucraron en el diseño de la investigación, gestionaron los recursos necesarios para su realización y supervisaron su desarrollo y redacción.

Las Propietarias de las queserías donde se recolectaron las muestras.

QFB. Juan Paulo Soltero Ramos y MVZ. Rosalba de la Mora Quiroz durante la etapa de identificación a nivel de especie.

DR. Paul M.V. MARTIN, Director del Laboratorio de *Listeria* del Instituto Pasteur en Francia, quien aceptó llevar a cabo la tipificación serológica y caracterización del DNA de los aislamientos de *Listeria monocytogenes*.

Los Revisores que tuvieron a su cargo hacer observaciones a la versión final de esta tesis.

Amable lector, gracias por dedicar parte de su tiempo al análisis de este documento que se redactó pensando en Usted, si respecto a su contenido le es útil intercambiar comentarios o aclarar dudas, estoy a sus ordenes a través de la dirección electrónica: beatrizr@maiz.cucba.udg.mx; en "asunto" favor de escribir: TesisM.

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Micrografía electrónica de <i>Listeria monocytogenes</i>	2
2. Patofisiología de la listeriosis	4
3. Diagrama de elaboración artesanal de quesos Panela, Ranchero y Adobera	26
4. Detección de inhibidores en leche	32
5. Técnica para el aislamiento de <i>Listeria</i> en queserías artesanales	34
6. Frecuencia de <i>Listeria</i> en queserías según categoría de muestra	37
7. Patrones de DNA genómico encontrados en aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> serotipo 1/2b procedentes de la quesería A	50
8. Patrones de DNA genómico encontrados en aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> serotipo 4b procedentes de la quesería C.....	51
9. Comparación entre los patrones de DNA genómico en aislamientos de <i>L. monocytogenes</i> serotipos 1/2b y 4b.....	52
10. Diseminación de <i>Listeria</i> en queserías artesanales.....	70

ÍNDICE DE CUADROS

1. Cuadros clínicos de listeriosis	5
2. Reportes de listeriosis en México (1966-2002).....	13
3. Casos de listeriosis asociados a productos lácteos contaminados en la fábrica donde fueron elaborados	16
4. Análisis de frecuencias de <i>Listeria</i> en 168 tipos de quesos elaborados fuera de EUA	17
5. Algunas características de la empresa artesanal	19
6. Características de las queserías artesanales en un municipio de Zapotlanejo, Jal.	25
7. Muestras recolectadas en queserías artesanales	29
8. Pruebas empleadas para la identificación de <i>Listeria</i> a nivel de género y especie	35
9. Muestras positivas a <i>Listeria</i> en queserías según tipo de muestra y quesería	38
10. Frecuencia de aislamiento de especies de <i>Listeria</i> en queserías	39
11. Productividad de los medios de aislamiento según tiempo de incubación del medio de enriquecimiento y quesería	40
12. Aislamiento de especies de <i>Listeria</i> según medio empleado y quesería	40
13. Ciclo de producción en queserías	41
14. Situaciones y prácticas observadas en queserías	42
15. Especies y serotipos de <i>Listeria</i> aislados de la quesería A, según muestra y fecha de muestreo.....	44
16. Especies de <i>Listeria</i> aisladas de la quesería B según muestra y fecha de muestreo	46
17. Especies y serotipos de <i>Listeria</i> aislados de la quesería C según muestra y fecha de muestreo	47
18. Especies de <i>Listeria</i> aisladas de la quesería D según muestra y fecha de muestreo	48

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μ l	Microlitro
BSDA	<i>Bacillus steratothermophilus</i> Disk Assay (Ensayo con disco de papel filtro empleando <i>Bacillus stearothermophillus</i> para la detección de inhibidores microbianos en leche).
ERS	Economic Research Service (Servicio de investigación económica del Departamento de Agricultura de EUA).
EUA	Estados Unidos de América.
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos de EUA).
HACCP	Hazard Analysis Critical Point (Sistema de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control).
ICMSF	International Comission for Microbiologiaca Specifications for Foods (Comisión Internacional para Especificaciones Microbiológicas de Alimentos).
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
PFGE	Pulse Field Gel Electrophoresis (Electroforesis de campo pulsante en gel)
USDA	United States Department of Agriculture (Departamento de Agricultura de EUA).

RESUMEN

La listeriosis humana es una enfermedad bacteriana causada por *Listeria monocytogenes* siendo el consumo de alimentos contaminados la principal vía de infección, su letalidad es del 36 - 45% y ha ocasionado pérdidas millonarias a industrias de alimentos. Los quesos han causado brotes y casos esporádicos de listeriosis. El consumo de quesos frescos en México es elevado. Se reconoce que la elaboración artesanal de quesos es parte de la economía de algunas poblaciones del estado de Jalisco. Se han reportado frecuencias altas (23% y 27%) de *Listeria monocytogenes*, en queso ranchero y panela elaborados artesanalmente que fueron vendidos en Guadalajara, Jal.

El objetivo de este trabajo fue determinar la participación de las fábricas en la contaminación con *Listeria* de los quesos elaborados artesanalmente, para este fin, se recolectaron en 4 queserías de un mismo pueblo, 379 muestras procedentes de leche cruda, cuajo, cuajadas, quesos, equipo, superficies, piso y enseres de limpieza. Para el aislamiento de *Listeria* las muestras se inocularon en Caldo de Enriquecimiento para *Listeria* durante 24 y 48h y se sembraron en Agar Feniletanol-Cloruro de Litio-Moxalactam y en Medio de Oxford Modificado; la identificación se realizó conforme al esquema de la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos de Norteamérica.

Ciento trece muestras (30%), fueron positivas a *Listeria*; el equipo, las superficies y los enseres de limpieza tuvieron los mayores porcentajes de muestras positivas: 45%, 20% y 16%, respectivamente. Las especies de *Listeria* aisladas fueron: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii*. Los aislamientos de *L. monocytogenes* se obtuvieron de dos queserías, en una de ellas, los serotipos encontrados fueron: 1/2a, 1/2b, 1/2inmóvil y 4d, en la otra quesería solo se aisló el serotipo 4b. El análisis molecular mostró la implantación en las queserías A y C de ciertas cepas de *L. monocytogenes*

Con base a los resultados obtenidos y a las prácticas de elaboración observadas, se concluye que: el piso y el refrigerador son las principales fuentes de contaminación con *Listeria* a partir de las cuales y a través del equipo y de las maniobras realizadas ocurre la contaminación de los quesos en las fábricas artesanales; en estos sitios, algunas especies y serotipos de *Listeria* pueden predominar y persistir durante más de un año; y que el empleo de tratamientos térmicos mayores de 70°C en el equipo, conjuntamente con el uso de jabón y cepillado frecuente de pisos y superficies pueden ser medidas factibles y efectivas para el control de *Listeria* en queserías artesanales.

I. INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

Listeriosis humana

Agente causal

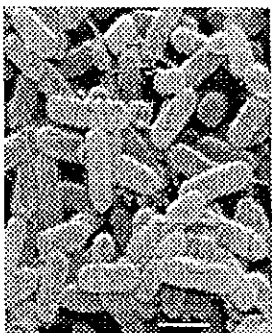


Figura 1.
Listeria monocytogenes
Microscopio electrónico
SCIMAT. INTERNET.

La listeriosis humana es causada por *Listeria monocytogenes* (Fig. 1), una bacteria gram positiva no esporulada, psicrótrofa, cuyo hábitat y reserservorio principal, al igual que todas las especies del género *Listeria*, es la vegetación en descomposición aislándose comúnmente del suelo, agua y excremento (Rocourt y Seeliger, 1985, citados por Fenlon, 1999).

Formas de infección

Actualmente se afirma que el consumo de alimentos contaminados es la principal fuente de infección y que el tracto gastrointestinal es el sitio primario de entrada de *Listeria* (Vázquez Boland *et al.*, 2001). El contacto directo de conjuntiva y piel con material contaminado son otras vías por las que puede adquirirse la enfermedad (Armstrong, 1995). Experimentalmente, la inhalación de aerosoles contaminados ha mostrado ser una efectiva vía de infección (Bracegirdle *et al.*, 1994); si bien son pocos los reportes asociados a esta vía de infección (Seeliger, 1961 y Schlech, 1984 citados por Bracegirdle *et al.*, 1994), es una vía que puede ocurrir en aquellos lugares donde se generan aerosoles como son los laboratorios, algunas industrias de alimentos y campos donde se esté aplicando excremento como abono (Bracegirdle *et al.*, 1994).

Período de incubación

El período de incubación de la listeriosis en promedio es de 3 semanas, (Riedo *et al.*, 1994) aunque puede oscilar en un rango de 1-70 días (Linnan *et al.*, 1998; Azadian *et al.*, 1989). Es posible que el período de incubación esté relacionado con la cantidad de listerias ingeridas; a mayor cantidad de listerias, menor tiempo de incubación (Riedo *et al.*, 1994). En personas inmunocompetentes la ocurrencia de la enfermedad posiblemente sea influida por la cantidad de microorganismos ingeridos (Pinner *et al.* 1992; Aureli *et al.*, 2000).

Fisiopatología de la listeriosis

Listeria monocytogenes es una de las bacterias más invasoras, infecta: hepatocitos, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales (Rocourt y Cossart, 1997), células endoteliales (Drevets, 1997), astrocitos, oligodendrocitos y neuronas (Dramsi *et al.*, 1998). Se asume que la multiplicación de *L. monocytogenes* en enterocitos desencadena un cuadro de gastroenteritis febril (Vázquez Boland *et al.*, 2001, Figura 2). El hígado es considerado el primer órgano blanco, donde la infección es controlada mediante inmunidad celular, esto puede ser un evento subclínico común debido a la presencia frecuente de *L. monocytogenes* en los alimentos; en individuos normales, la exposición continua a antígenos de *Listeria* probablemente contribuye la persistencia de linfocitos T contra *Listeria* (Vázquez Boland *et al.*, 2001). En pacientes débiles o inmunocomprometidos, *Listeria* se multiplica sin restricción en el hígado pudiendo conducir a: una bacteremia de bajo nivel, invasión de útero grávido o de cerebro, desencadenándose la enfermedad clínica (Vázquez Boland *et al.*, 2001, Figura 2). Los altos niveles de hormonas estrogénicas al final de la gestación puede ser que actúen como los esteroides inhibiendo la proliferación de linfocitos T la función de destrucción intracelular en macrófagos, lo que explica en parte la susceptibilidad a la enfermedad en mujeres que se encuentran en etapas avanzadas de gestación (Vázquez Boland *et al.*, 2001).

Principales cuadros clínicos

La listeriosis humana se manifiesta por diversos cuadros clínicos entre los que destacan las infecciones durante el embarazo y del sistema nervioso (Cuadro 1, Fig. 2). Esta enfermedad ha sido considerada una enfermedad oportunista porque la mayoría de los casos de listeriosis ocurre en personas que tienen condiciones fisiológicas (embarazo) o patológicas que afectan la inmunidad mediada por linfocitos T (Vázquez Boland *et al.*, 2001) sin embargo, también ha sido reportada en adultos inmunocompetentes y personas con enfermedades no asociadas a inmunosupresión (Rocourt, y Cossart, 1997).

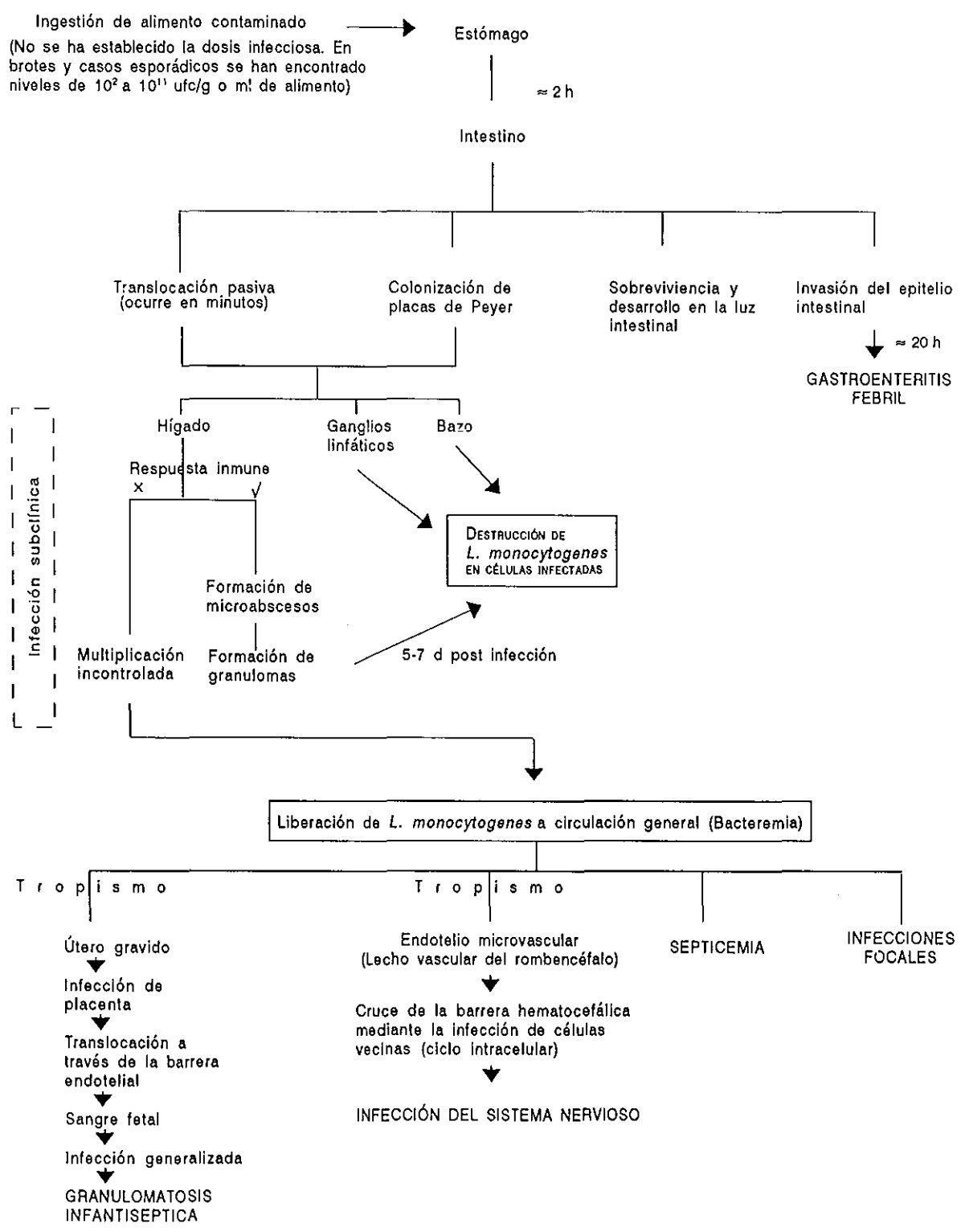


Figura 2. Fisiopatología de la listeriosis (Adaptada de: Vázquez Boland *et al.*, 2001).

Infección durante el embarazo

En mujeres embarazadas, generalmente la enfermedad ocurre en el último trimestre de gestación, presentándose con síntomas parecidos a influenza o infección urinaria: fatiga, escalofríos, fiebre; dolor en espalda, cabeza, músculos y articulaciones. Entre 2 - 14 días después que ocurren estos síntomas sobreviene aborto o parto prematuro (Armstrong, 1995; Vázquez Boland *et al.*, 2001).

Granulomatosis infantiséptica

La transmisión a través de la placenta causa la granulomatosis infantiséptica, un tipo de infección que al parecer ocurre solo en humanos. Al nacimiento, el niño presenta pápulas o

ulceraciones en la piel del tronco o en las extremidades; internamente se encuentran abscesos y granulomas en hígado, bazo, pulmones, riñón y cerebro. La mortalidad es cercana al 100% (Armstrong, 1995).

Septicemia

El cuadro septicémico de listeriosis es observado en recién nacidos y adultos inmunosuprimidos: se presentan escalofríos, fiebre y en raras ocasiones se observa en el frotis, monocitosis del 8% o más (Armstrong, 1995). Este cuadro puede conducir a las presentaciones cerebrales.

Cuadro 1. Cuadros clínicos de listeriosis.

Infección durante el embarazo

Granulomatosis infantiséptica

Septicemia

Infección del sistema nervioso
meningitis
cerebritis
rombencefalitis

Infecciones focales:
abscesos en cerebro
y médula espinal
endocarditis
colecistitis
peritonitis
artritis
infección de prótesis
osteomielitis

Listeriosis cutánea
Conjuntivitis y uveítis

Enfermedad gastrointestinal febril

Fuente: Armstrong, 1995 ; Wing y Gregory, 2002

Infección del sistema nervioso

La meningitis neonatal causada por *L. monocytogenes* ocurre alrededor del tercer día de nacido, es evidenciada por: dificultad para alimentarse, respiración rápida y superficial, ligera cianosis, letargia, fiebre y anorexia; después aparecen convulsiones, temblores musculares, respiración entrecortada, cianosis severa, e irritabilidad, el pronóstico es desfavorable, lo mas común es que el paciente muera (Ryser y Marth, 1991; Armstrong, 1995).

En adultos, la meningitis por *L. monocytogenes* puede ser fulminante o subaguda. La presentación fulminante es rara, se presenta en hombres mayores de 50 años, clínicamente no puede ser diferenciada de otras meningitis se presenta coma muriendo alrededor del 70% de los pacientes. Las personas que logran sobrevivir pueden tener secuelas que incluyen: hidrocefalo, edema cerebral y atrofia cerebelar (Armstrong, 1995; Seeliger y Finger, 1976; Marrie *et al.*, 1984, citados por Ryser y Marth, 1991). Los síntomas de la meningitis subaguda son: fiebre de baja intensidad, cambio en la personalidad, sordera, signos asociados a daño en los nervios craneales y hemiplejía (Armstrong, 1995).

Los síntomas de cerebritis pueden ser solo fiebre, dolor de cabeza o varios grados de parálisis que semejan accidente cerebrovascular (Armstrong, 1995).

La encefalitis listérica del tallo cerebral (rombencefalitis) es rara, inicia con dolor de cabeza, fiebre, nausea y vómito, continuando con debilidad progresiva simétrica de los nervios craneales, ataxia y algunas veces convulsiones y hemiparesis (Armstrong, 1993; Armstrong, 1995; Slutsker y Schuchat, 1999).

Ryser y Marth (1991) señalan que la encefalitis listérica exhibe dos fases: la primera tiene una duración de alrededor de 10 días y se caracteriza por dolor de cabeza, dolor de espalda, vómito, conjuntivitis y rinitis. La segunda fase inicia 10 días después con fiebre elevada la cual es seguida de disturbios en el sistema nervioso central; si la víctima no es tratada con antibióticos, la muerte ocurre 2-3 días después.

Listeriosis cutánea

La listeriosis cutánea ha ocurrido en veterinarios y granjeros que estuvieron en contacto con placentas y fetos abortados (McLauchlin y Low, 1994) y en personas inmunosuprimidas (Seeliger, 1961 y Slata *et al.*, 1986, citados por McLauchlin y Low,

1994). La enfermedad tiene un periodo de incubación de 1-4 días, se presenta en las muñecas y antebrazos, inicia con salpullido seguido de lesiones hiperémicas de 1-2 mm de diámetro que evolucionan a vesículas o pústulas de las cuales puede ser aislada *L. monocytogenes* (McLauchlin y Low, 1994). Con un adecuado tratamiento antimicrobiano los pacientes se recuperan en 1 semana, sin tratamiento las lesiones han persistido un mes, siendo necesario el tratamiento para su resolución (McLauchlin y Low, 1994). Se ha reportado la muerte de un granjero que presentó listeriosis cutánea (Seeliger, 1961, citado por Ryser y Marth, 1991).

Enfermedad gastrointestinal febril

La gastroenteritis por *L. monocytogenes* es el cuadro clínico en el que se han reportado períodos de incubación cortos: 9-32 horas (Craig *et al.*, 1997) aunque puede presentarse dentro de los 21 días posteriores al consumo del alimento contaminado (Riedo *et al.*, 1994). Los síntomas observados son: fatiga, elevación de la temperatura (37.8-40.3 °C), escalofríos, dolor de cabeza, mialgias, artralgias, náusea, vómito, dolor abdominal, diarrea (mediana de 12 evacuaciones en 24 horas) (Riedo *et al.*, 1994; Craig *et al.*, 1997). Los síntomas pueden persistir durante 3-4 días (Miettinen *et al.*, 1999).

Diagnóstico

Solo la granulomatosis infantiséptica presenta un síndrome característico (Davis 1993, Vázquez Boland, 2001). El aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de líquido cefalorraquídeo, sangre o de otros sitios normalmente estériles constituyen la base del diagnóstico para esta enfermedad (Davis, 1993, Slutsker y Schuchat, 1999). El cultivo de excremento en caldo de enriquecimiento selectivo ha sido empleado para el diagnóstico de gastroenteritis febril (Slutsker y Schuchat, 1999). La medición de anticuerpos contra listeriolisina O representa una prueba promisoría para apoyar el diagnóstico de listeriosis invasiva y no invasiva; esta prueba fue utilizada en la investigación de un brote de gastroenteritis febril (listeriosis no invasiva) transmitida por consumo de leche con chocolate (Craig *et al.*, 1997).

Tratamiento

El tratamiento de la listeriosis es complicado porque en el huésped, *L. monocytogenes* desarrolla un ciclo de vida intracelular y una difusión de célula a célula, que reduce su exposición solo a aquellos antimicrobianos capaces de introducirse en células eucarióticas y, de traspasar la barrera hematoencefálica, por ello aún cuando la

sensibilidad "in vitro" muestre que la bacteria es susceptible a un amplio rango de antimicrobianos, las opciones terapéuticas son reducidas (Riviera *et al.*, 1993; Jones y MacGowan, 1995, Hof *et al.*, 1997).

Las dosis y duración del tratamiento de listeriosis han sido descritas por Jones y MacGowan (1995). La duración del tratamiento oscila entre 7 días (casos de bacteremia), 20 días (meningitis aguda) u 8 semanas (endocarditis) y puede quedar por tiempo indefinido en casos de personas con prótesis articulares (Jones y MacGowan, 1995).

En medicina humana, el tratamiento de elección es ampicilina o penicilina combinada con gentamicina; para personas alérgicas a beta láctamicos, la opción es el sulfametoxazol-trimetoprim (Jones y MacGowan, 1995, Hof *et al.*, 1997). El empleo de penicilinas solas o combinadas con aminoglucósidos al inicio de la enfermedad tiene un mejor pronóstico, pues hay menor letalidad e incluso puede haber recuperación completa (Skokberg *et al.*, 1992, Fuchs *et al.*, 1994). La vancomicina es apropiada para la bacteremia primaria pero no cruza bien la barrera hematoencefálica, la eritromicina puede ser útil en los casos de embarazo (Jones y MacGowan, 1995). Con relación a las quinolonas, la sensibilidad de *L. monocytogenes* es variable; Troxler *et al.* (2000) reporta que el comportamiento de este microorganismo oscila entre sensible a intermedio con relación a ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina y fleroxacina; mientras que respecto a enoxacina, pefloxacina y sparfloxacina, su comportamiento de intermedio a resistente. Puesto que *L. monocytogenes* presenta una resistencia natural a las cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, cefalotina, cefuroxima, cefalexina y ceftriaxona), monobactámicos (aztreonam), fosfomicina y ácido fusídico (Hof *et al.*, 1997, Troxler *et al.*, 2000) estos antimicrobianos no deberán administrarse en casos de listeriosis. En *Listeria monocytogenes*, la proteína PBP3 es el blanco primario de los beta lactamicos, las penicilinas y el imipenem se ligan fuertemente a esta proteína en tanto que las cefalosporinas y los monobactámicos se ligan pobremente a ella, lo que explica la resistencia de *Listeria* a estos antimicrobianos (Vicente *et al.*, 1990).

La resistencia antimicrobiana es otro aspecto que puede complicar el tratamiento de listeriosis. Hasta 1988 se había considerado en medicina humana que *Listeria* era uniformemente susceptible a los antimicrobianos (Charpentier y Courvalin, 1999), en ese año, a partir de un caso clínico, aislaron una cepa de *L. monocytogenes* resistente a: cloranfenicol, eritromicina, estreptomina y tetraciclina; el paciente murió (Poyart-

Salmeron *et al.*, 1990). Facinelli *et al.* (1991) reportaron cepas de *L. monocytogenes* y *L. innocua* multirresistentes aisladas de queso mozzarella y salchichas de pavo y pollo, la resistencia reportada por estos autores estuvo relacionada a los siguientes antimicrobianos: estreptomina, gentamicina, kanamicina, rifampicina, sulfametoxazol y tetraciclina. *L. monocytogenes* puede encontrarse en el tracto digestivo de humanos y animales, sitio donde también están presentes en gran cantidad, diversas especies de *Enterococcus* y *Streptococcus* que albergan plásmidos conjugativos y transposones (Charpentier y Courvalin, 1999). Plásmidos detectados en cepas de *L. monocytogenes* han mostrado similitud con plasmidos de *Enterococcus* y *Streptococcus* lo que sugiere que el origen de la resistencia antimicrobiana múltiple en cepas de *L. monocytogenes* sea resultado de un intercambio de información genética de estas especies en el tracto gastrointestinal y también un intercambio de información genética entre las especies de *Listeria* (Charpentier y Courvalin, 1999).

Pronóstico

El desenlace de la listeriosis es influido por el sitio donde ocurre la infección, las condiciones inmunológicas del paciente y la efectividad del tratamiento aplicado.

En infecciones del sistema nervioso, la muerte ocurre en aproximadamente el 50% de los casos y la mayoría de los sobrevivientes presenta secuelas neurológicas como paresia de nervios craneanos y hemiparesia (Davis, 1993), hipoacusia (Jornada-Krebs *et al.*, 1997), retardo mental, hidrocefalia, edema cerebral, atrofia cerebelar y parálisis (Ryser y Marth, 1991).

La mortalidad y las secuelas son mas frecuentes en inmunosuprimidos, pacientes con una enfermedad subyacente o con transplante reciente (Skogberg *et al.*, 1992). En inmunosuprimidos es posible que ocurra una erradicación incompleta de la bacteria o una reinfección, por lo que puede ocurrir mas de un episodio de listeriosis en estos pacientes (Skogberg *et al.*, 1992).

Aspectos epidemiológicos

La epidemiología de la listeriosis humana comenzó a investigarse en forma sistemática a partir del aumento de reportes de la enfermedad ocurridos a fines de la década de 1970 y principios de la década de 1980, cuando se estableció que la listeriosis es una infección vehiculizada por alimentos (Vázquez Boland *et al.*, 2001).

La refrigeración durante la obtención, transporte, o almacenamiento de alimentos, la susceptibilidad de personas inmunocomprometidas, el consumo de alimentos crudos o inadecuadamente cocinados y el uso de leche no pasteurizada en la elaboración de quesos, son los factores que intervienen en la presentación de listeriosis vehiculizada por alimentos (Smith y Fratamico, 1995).

Los alimentos implicados en brotes de listeriosis en general, son alimentos producidos industrialmente, refrigerados, listos para consumo o que son consumidos sin un recalentamiento previo (Slutsker y Schuchat, 1999; Vázquez Boland *et al.*, 2001). En este grupo de alimentos destacan, por haber ocasionado brotes de listeriosis: ensaladas (Schlech *et al.*, 1983; Aureli *et al.*, 2000), leche (Fleming *et al.*, 1985, Craig *et al.*, 1997), quesos blandos (Linnan *et al.*, 1988; Boggs *et al.*, 2001), productos cárnicos (Loncaveric *et al.*, 1997; Valk *et al.*, 2001) y pescado ahumado (Ericsson *et al.*, 1997; Miettinen *et al.*, 1999).

Las conexiones entre listeriosis humana y animal no son claras pues los picos de incidencia de listeriosis humana han sido observado en verano y otoño (Siegman-Ingra *et al.*, 2002) en tanto que los picos de listeriosis animal ocurren en primavera (McLauchlin, 1997). Por otra parte, la listeriosis cutánea solo representó el 1.1% de los casos de listeriosis ocurridos en Inglaterra entre 1989 a 1994 (McLauchlin y Low, 1994). Se especula que la variación estacional puede ser debida al consumo de ciertos alimentos en determinadas épocas del año o a un mal manejo de alimentos a temperaturas ambientales elevadas (Siegman-Ingra *et al.*, 2002).

Se estima que a nivel mundial, la incidencia anual de listeriosis perinatal es de 0.4 a 4.1 casos por cada diez mil nacimientos y la incidencia de listeriosis no perinatal es de 0.1 - 1.1 casos por diez mil habitantes (Siegman-Ingra *et al.*, 2002) por lo cual se le considera una enfermedad rara, sin embargo, en situaciones epidémicas, la incidencia en la población blanco se incrementa a un factor de 3-10 veces (Vázquez Boland *et al.*, 2001). Un brote de listeriosis gastrointestinal ocurrido en 2 escuelas afectó a 1566 personas, requiriendo hospitalización 292 (19%) (Aureli *et al.*, 2000). Se han reportado incidencias elevadas para listeriosis esporádica en Barcelona, España -10.9 casos/millón de habitantes anualmente- y en Francia -14.7 casos por millón de habitantes- (Vázquez Boland *et al.*, 2001).

A partir del aislamiento en heces, se ha establecido que del 1 al 9% de la población humana es portadora de *L.monocytogenes* (Ralovich, 1984, citado por Ryser y Marth, 1991). Mascola *et al.* (1992), reportaron la prevalencia y duración de portadores fecales de *Listeria* en personas relacionadas con el brote de listeriosis por consumo de queso estilo mexicano ocurrido en el condado de Los Ángeles California, se encontró un 7.9% de portadores y estado de portador hasta por 20 semanas. Schuchat *et al.* (1993), sugieren que los portadores de *L. monocytogenes* son mas comunes en contactos (personas que regularmente duermen o comen en la casa de personas que enfermaron de listeriosis) que en la población en general, sin embargo, no se detectaron casos secundarios de listeriosis en contactos durante los 5 años de vigilancia activa de listeriosis en una población de 18 a 34 millones de personas (Schuchat *et al.*, 1993). La frecuencia de portadores en los contactos pudiera deberse a que estos tienen preferencias por alimentos similares a la de los pacientes o pueden estar expuestos a *L. monocytogenes* a través de la contaminación cruzada de alimentos en el hogar, evidenciándose así el papel decisivo que puede tener la susceptibilidad del huésped en la ocurrencia de listeriosis. (Schuchat *et al.*, 1993).

Siegman-Igra *et al.* (2002), con base a estudios publicados en los últimos 10 años estiman que a nivel mundial la letalidad de la listeriosis perinatal es del 45% y la no perinatal se estima en 36% y que el 60 % de los casos de listeriosis no perinatal, ocurren en hombres.

Los grupos con mayor riesgo de contraer listeriosis son: las mujeres gestantes, recién nacidos, adultos mayores de 55 años, pacientes con cáncer, VIH, SIDA, enfermedad hepática crónica (cirrosis o alcoholismo), diabetes, lupus, problemas renales, y personas recibiendo tratamientos con antiácidos, corticoesteroides u otros inmunosupresores (Slutsker y Schuchat, 1999; Vázquez Boland *et al.*, 2001).

Dentro de los agentes bacterianos causantes de meningitis, *L. monocytogenes* ocupa el primer lugar en pacientes inmunocomprometidos, el tercero en neonatos y el cuarto en adultos no inmunocomprometidos (Vázquez Boland *et al.*, 2001).

Reportes de listeriosis en México

En 1960, Gardida y Vergara (citados por Ramírez Aguilar *et al.*, 1967) publicaron el primer reporte de listeriosis humana en México, desde entonces, la mayoría de los reportes de listeriosis publicados en nuestro país han surgido de las áreas de pediatría-ginecología de diversos hospitales (Cuadro 2). Bonfil *et al.* (1990), reportan que, con base a hemocultivos y cultivos de líquido cefalorraquídeo, en el Hospital Infantil de México, de 1976 a 1980 solo se reportaron 3 casos de listeriosis. Solórzano Santos *et al.* (1989), reportaron que de enero de 1987 a junio de 1988, se registraron 7 casos de listeriosis en el Instituto Nacional de Perinatología, cifra que para este hospital significa 6.6 casos de listeriosis por cada 10, 000 nacidos vivos, frecuencia que, comparada con las reportadas a nivel mundial (0.6 - 4.1 casos por 10,000 - Siegman-Ingra *et al.*, 2002) es inusualmente alta, situación que los autores atribuyen a que en este hospital se atienden exclusivamente embarazos de alto riesgo. Escárcega *et al.* (1999), informaron que en Hospital Ángeles del Pedregal, se atendieron entre octubre de 1997 y abril de 1998, 3 casos de listeriosis materno-fetal; del hemocultivo de una de las pacientes se aisló *Listeria* resistente a ampicilina. Kraus *et al.*, (1994) en un hospital de tercer nivel en la Ciudad de México, hicieron un estudio retrospectivo acerca de la frecuencia de aislamientos de *L. monocytogenes* en pacientes con enfermedades del tejido conectivo, encontraron que en el período 1982 - 1992 se aisló *L. monocytogenes* de 8 pacientes: 7 padecían lupus eritematoso y uno dermatomiositis; el microorganismo fue aislado de líquido cerebroespinal (5 pacientes), sangre (1 paciente) y de ambos sitios en dos pacientes.

A la fecha, no existen publicaciones de brotes de listeriosis asociados al consumo de alimentos que hayan ocurrido en México, es posible que esto se deba a que en este país la listeriosis no es una enfermedad de reporte obligatorio (Secretaría de Salud, 1999).

Cuadro 2. Reportes de listeriosis en México (1960 - 2002).

TÍTULO	REFERENCIA
Meningoencefalitis por <i>Listeria monocytogenes</i> : Historia de un caso.	Gardida A. y L. Vergara. 1960. Bol. Med. Hosp. Inf. (Mex). 23: 95-101
La infección perinatal listérica en México. I. Investigación de <i>L. monocytogenes</i> en exudado vaginal.	Giono S y A. Pérez Miravete. 1963. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Mex). 23: 95-101.
La infección perinatal listérica en México II. Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en septicémica de recién nacido.	Giono S y A. Pérez Miravete. 1963. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Mex). 23: 103-113.
La infección perinatal listérica en México III. Titulación de anticuerpos anti <i>Listeria</i> en mujeres embarazadas y no embarazadas	Giono S y A. Pérez Miravete. 1963. Rev. Inst. Sal. Enf. Trop. (Mex). 23: 115-119.
Infección por <i>Listeria monocytogenes</i> en la Ciudad de México. Su hallazgo en dos niños con meningitis y una persona adulta con septicemia.	Olarte J., H.P. Mendoza, L.Vergara, y A. Gardida. 1963. Bol Med Hosp Infant Mex. 20 : 161-167.
Un caso de meningitis purulenta producida por listeria (<i>sic</i>) monocytogenes	Sánchez Rebolledo JM, A. Martínez Ruiz y D. Bessudo M. 1965. Bol Med Hosp Infant Mex. 22 : 321- 324.
[Mexican contributions to the study of listeriosis] [†]	Varela G. 1966. Rev Latinoam Microbiol Parasitol (Mex) 8: 93.
La infección perinatal listérica en Puebla.	Victoria R.V, Vanzzini, y A. Pérez Miravete. 1966. Resúmenes del VI Congreso Nacional de Microbiología. Hermosillo , Mex.
[Isolation of <i>Listeria monocytogenes</i> related to abortion and perinatal death in Puebla city]	Vanzzini V.R., y A. Pérez Miravete. 1967. Rev Invest Salud Publica 27 : 129-136.
[Inapparent infections of bacterial origin]	Pérez Miravete A. 1967. Rev Invest Salud Publica 27: 262-274.
[Various studies on listeria infections]	Pérez Miravete A. 1969. Gac Med Mex 99: 107-128.

Continúa...

Investigación de *Listeria monocytogenes* en niños con diagnóstico de meningoencefalitis.

Infección por *Listeria monocytogenes*.

Infección sistémica neonatal por *Listeria monocytogenes*.

Listeriosis neonatal. Reporte de tres casos.

Listeriosis in patients with connective tissue diseases

Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* en niños inmunocomprometidos

Meningoencefalitis. Etiología de 2121 casos confirmados bacteriológicamente.

Listeriosis neonatal: reporte de un caso

Listeriosis materno-fetal: reporte de tres casos

Identificación de los gérmenes causantes de sepsis neonatal temprana en niños de alto riesgo en el estado de Yucatán.

Ramírez Aguilar A., A. Pérez Miravete y S. Trejo. 1967. Bol Med Hosp Infant Mex. 24 : 655-658.

Filloy Y.L., G.E. Borjas. 1976. Bol Med Hosp Infant Mex. 33: 547-553.

Solorzano Santos F., J.L. Arredondo Garcia, E. Udaeta Mora, F.J. Ortiz Ibarra, G. Echániz Avilés, M. Beltrán Zuñiga. 1989. Bol Med Hosp Infant Mex. 46 : 709 - 714

Bonfil A.A., S.L. Sánchez, A.L. Pineda y G.D. Villanueva. 1990. Bol Med Hosp Infant Mex. 47 : 437-438.

Kraus A., A.R. Cabral, J. Sifuentes Osornio, y D. Alarcón Segovia. 1994. J Rheumatol 21: 635 - 638.

Castrejón Alba M., T. Mateo Balmelli .1997. Bol Med Hosp Infant Mex. 54: 76-80.

Barriga Ángulo G., N.H. Castillo Torres y L. Rojas Molina. 1997. Patología Clínica. 44: 241-244.

Montes OMG, G. Rodríguez, P. Casaubón, C.L. Aldrete, H.L. Molinar, R. Ángeles, R. Hernández y R. Peña. 1999. Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría. 6 (34): 240-244.

Escárcega H., R. Peñaloza, O. Montes, R. Peña, H. Godoy, M. Negrin, R. Rodríguez y P. Anaya. 1999. Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría. 6 (35): 290-296.

Marrufo Olivares C., N. Arias C., L. Escalante Zapata, J.M. Pino Rosado, W. Herrera, F. Vargas Quintal, J.L. Caceres Solis, C. Ortegon Zapata, Alonzo-Ileana, G. Dzib Rosado y J. Cuervo Moguelco. 2000. Rev. Biomed. 11(1): S31-S32

Fuente: † Indexadas en Medline. No fue posible consultarlas.; Sánchez Rebolledo *et al.*, 1965; Ramírez Aguilar *et al.*, 1967; Solórzano Santos *et al.*, 1989; Bonfil *et al.*, 1990; Kraus *et al.*, 1994; Barriga Angulo *et al.*, 1997; Castrejón Alba *et al.*, 1997; Montes *et al.*, 1999; Escárcega *et al.*, 1999; Marrufo Olivares *et al.*, 2000.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Impacto económico y social de la listeriosis

La listeriosis vehiculizada por alimentos que tiene un elevado costo económico y social. Su letalidad, ubicada en 36 - 45% es alta (Siegman-Igra et al, 2002). Mead *et al.* (1999), estiman que *Listeria* causa el 28% de las muertes asociadas al consumo de alimentos en EUA. Mas del 11% de los recién nacidos y el 30% de los adultos que sobreviven a una infección por *Listeria* en el sistema nervioso, quedan con secuelas (Bula et al, 1995; Frederiksen y Samuelsson, 1992, citados por Rocourt y Cossart, 1997). Las secuelas ocasionadas por listeriosis en recién nacidos tienen un costo anual estimado de 11.3 millones de dólares y el impacto económico anual de los casos agudos de listeriosis vehiculizada por alimentos en EUA, ha sido estimado en 2.3 billones de dólares, considerando que por esta causa, son hospitalizadas 2,298 personas de las cuales 499 mueren y 62 desarrollan complicaciones crónicas (ERS, USDA, 2002).

Consecuencias de la presencia de *L. monocytogenes* en fábricas de alimentos

La investigación de brotes (Linnan *et al.*, 1988; Craig *et al.*, 1997; Valk *et al.*, 2001) y casos esporádicos de listeriosis (McLauchlin *et al.*, 1990; Loncarevic *et al.*, 1997) ha evidenciado que la contaminación de los alimentos en los sitios donde son elaborados, ha sido un elemento decisivo para que ocurra la enfermedad (Gravani, 1999; Cuadro 3). Estas investigaciones también han mostrado que la listeriosis representa para los procesadores de alimentos un problema de seguridad de alimentos que puede poner en riesgo la viabilidad de las empresas (Linnan *et al.*, 1988; Ryser, 1999a). El brote de listeriosis por queso estilo mexicano ocurrido en Los Ángeles, California condujo a los propietarios a enfrentar pagos elevados por multa - \$ 9, 300 dólares-, investigación - \$ 617, 204 dólares- y demandas de los afectados - \$ 700 millones de dólares- (Anónimo, 1986; Todd, 1988, citados por Ryser, 1999a). El brote ocurrido en Suiza por consumo del queso Vacherin Mont d'Or tuvo un costo estimado de 1.4 millones de dólares (Waites *et al.*, 1991, citados por Ryser, 1999a). En 1986, el aislamiento en EUA de *L. monocytogenes* a partir de quesos importados de Francia

Cuadro 3. Casos de listeriosis asociados a productos lácteos contaminados en la fábrica donde fueron elaborados.

Lugar	Año	Casos	Muertos	Alimento implicado	Referencia
Boston, Massachusetts, EUA	1983	49	12 adultos 5 neonatos 2 fetos	Leche pasteurizada, no se aisló <i>L. monocytogenes</i> de la leche. Epidemiológicamente la leche fue el alimento implicado.	Fleming <i>et al.</i> , 1985
Cantón de Vaud, SUIZA	1983-1987	122	31	Queso blando Vacherin Mont d'Or. La cepa causante del brote fue aislada del equipo y bodegas de las queserías donde se elaboraba el queso.	Bille <i>et al.</i> , 1990 ; Gravni, 1999
Los Ángeles, EUA	1985	142	18 adultos 10 neonatos 30 fetos	Queso blando estilo mexicano. <i>L. monocytogenes</i> del mismo fagotipo que el de la cepa causante del brote fue aislada de las tinajas y drenaje de la fábrica.	Linnan <i>et al.</i> , 1988
INGLATERRA	1988	1	0	Queso blando "Anari". <i>L. monocytogenes</i> del mismo fagotipo que el de la cepa aislada de la paciente fue aislada de quesos y anaqueles de lugar donde se elaboraba el queso.	McLauchlin <i>et al.</i> , 1990
Illinois, EUA	1994	66	0	Leche con chocolate. Las cepas de <i>L. monocytogenes</i> aisladas de pacientes, leche con chocolate, drenaje ubicado abajo de la máquina llenadora y de la válvula conectada al pasteurizador fueron idénticas a nivel de serotipo y patrones de macrorrestricción de DNA.	Craig <i>et al.</i> , 1997
Helsinki, FINLANDIA	1999	25	No señalado	Mantequilla. La cepa de <i>L. monocytogenes</i> aislada de los pacientes fue idéntica a nivel de serotipo y patrones de macrorrestricción de DNA a los aislamientos encontrados en: el tornillo transportador de mantequilla y 2 drenajes ubicados debajo del contenedor de mantequilla al que estaba insertado el tornillo (gusano) transportador.	Lyytiäinen <i>et al.</i> , 2000

Fuente: Fleming *et al.*, 1985; Bille *et al.*, 1990 citados por Jay, 1992 ; Linnan *et al.*, 1988; McLauchlin *et al.*, 1990; Craig *et al.*, 1997; Lyytiäinen *et al.*, 2000.

condujo a la devolución de 300 toneladas de queso Brie elaboradas por cinco productores franceses (Ryser, 1999b).

Frecuencia de *Listeria* en quesos

La frecuencia de *L. monocytogenes* en quesos ha sido estudiada en diversos lugares. En Estados Unidos, Inglaterra, Gales y varios países europeos, los porcentajes oscilan entre 0.7% y el 14.5% (Beckers *et al.*, 1987; Pini y Gilbert, 1988; Genigeorgis *et al.*, 1991; Greenwood *et al.*, 1991). Ryser (1999c) enlista las frecuencias de *Listeria* en 168 tipos de quesos elaborados en distintos países y 9 elaborados en EUA, de estos trabajos se aprecia que el rango de frecuencia de *Listeria* en quesos oscila del 0-87%, pero que las frecuencias que predominaron fueron menores al 10% (Cuadro 4) ; la investigación que reportó frecuencia del 87% fue un estudio en el que solo se analizaron 23 muestras de queso .

Cuadro 4. Análisis de frecuencias de *Listeria* en 168 tipos de quesos elaborados fuera de EUA.

Especie	Rango	Promedio	Mediana	Moda
<i>L. monocytogenes</i>	0 - 87 %	4.62 %	1.25 %	0.00 %
<i>L. innocua</i>	0 - 42 %	6.59 %	2.4 %	0.00 %
Otras especies de <i>Listeria</i>	0 - 32 %	2.89 %	0.0 %	0.00 %

Fuente: Ryser, 1999c.

En México se encontró un 2 % de incidencia de *L. monocytogenes* en quesos vendidos en el mercado de Chalco (Vizcaíno Forcada y Mustre de León, 1992), mientras que en queso tipo rancho y panela vendidos en mercados de Guadalajara, Jalisco, se reportan frecuencias del 23 y 27 %, respectivamente, (Luis Juan Morales *et al.*, 1992a y 1992b). En sus investigaciones, Luis Juan Morales (1994), observó que el 70% de las muestras positivas de queso panela y el 53% de las muestras positivas de queso coincidentemente procedían de una misma población donde estos productos se elaboran artesanalmente.

Importancia de los quesos blandos como vehículo de *L. monocytogenes*

Los quesos blandos de baja acidez, junto con el paté son alimentos que se han encontrado asociados a una gran cantidad de casos de listeriosis y son productos que pueden soportar el crecimiento de grandes poblaciones de *L. monocytogenes* (Doyle, 1994). En su mayoría, los quesos antes de su consumo, no se someten a un tratamiento que sea capaz de destruir a *L. monocytogenes*: 70°C/4.6 ± 0.5 seg (Bunning et al, 1986, citados por Lou y Yousef, 1999). Los quesos estilo mexicano han sido ubicados como uno de los alimentos con mayor riesgo de ocasionar casos esporádicos de listeriosis (Schuchat *et al.*, 1992, Pinner *et al.*, 1992), además de haber ocasionado brotes de esta enfermedad (Linnan *et al.*, 1988; Boggs *et al.*, 2001).

Producción de quesos blandos en México.

El queso fresco y la panela son productos de amplio consumo en México; de acuerdo con la encuesta industrial mensual del INEGI, el volumen de producción de queso fresco y panela en el primer cuatrimestre de 2001 ascendió a 15, y 4, millones de kilos, respectivamente (INEGI, 2001).

Producción artesanal de quesos en Jalisco

Al registrarse en 1998, una producción bruta con valor de seis mil millones de pesos, 1,346 unidades económicas y un promedio de 9,596 personas empleadas, Jalisco es el estado con mas personas dedicadas a la elaboración de productos lácteos y se ubica en el segundo lugar nacional en producción y número de establecimientos dedicados a esta rama económica (INEGI, 2002). En la zona metropolitana de Guadalajara y los municipios de Lagos de Moreno, y La Barca se ubican importantes plantas que elaboran a nivel industrial productos lácteos, en tanto que poblaciones como: Tapalpa y Jilotlán de los Dolores, son reconocidas por la producción artesanal de quesos (García Ramírez, 1996 y 2002). Las principales características de la producción artesanal se presentan en el Cuadro 5, cabe reconocer que las actividades artesanales relacionadas con la alimentación se mantienen gracias a las preferencias de los consumidores (Gran Enciclopedia Larousse, 1990).

Cuadro 5. Algunas características de la empresa artesanal.

-
- La elaboración de los productos se hace siguiendo métodos tradicionales e individuales.
 - Predomina el trabajo manual.
 - El número de trabajadores es pequeño.
 - La forma de trabajo excluye la parcelación de tareas.
 - La mano de obra es el factor de producción preponderante .
 - Utilización de equipo limitado, a menudo polivalente, que permite una mayor flexibilidad de las tareas a ejecutar.
 - Se ubican cerca de las viviendas, contribuyendo a la vida social y a la animación de las ciudades y de las zonas rurales.
 - Tienen unas relaciones privilegiadas con la clientela que resultan de la calidad de los productos y servicios ofrecidos.
-

Fuente: Gran Enciclopedia Larousse, 1990.

En Jalisco, Los quesos de elaboración artesanal se venden generalmente en los mercados y tianguis. Al parecer no se cuenta con estadísticas de la producción de quesos a nivel artesanal, un indicio de la demanda que tiene el consumo de estos quesos es "La cotijense", una cremería ubicada en el centro de Guadalajara, Jal, que tiene mas de 70 años vendiendo lácteos elaborados artesanalmente.

A partir de la información arriba señalada, se desprende que la listeriosis humana tiene consecuencias negativas importantes desde el punto de vista social y económico, además, se identifica que la frecuencia de *Listeria monocytogenes* en panela y queso rancharo elaborados artesanalmente es mayor a la reportada en otros lugares pero se desconoce como ocurre la contaminación con *Listeria* de estos productos que son de amplio consumo y son parte de la economía de varias poblaciones de Jalisco.

JUSTIFICACIÓN

Los elevados costos económicos y sociales que implican los brotes y casos esporádicos de listeriosis (Ryser 1999a; Ryser 1999b; Mead *et al.*, 1999; ERS, USDA, 2002) han conducido a buscar medidas que controlen la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos.

El control de *L. monocytogenes* en alimentos comprende 3 aspectos: la eliminación o reducción del patógeno en las materias primas, la prevención de la contaminación durante la elaboración de los alimentos y la prevención de la recontaminación y/o la inhibición del patógeno en el alimento listo para su consumo (Eklund *et al.*, 1995).

Goulet *et al.* (2001), señalan que el conjunto de medidas de control y prevención de la listeriosis vehiculizada por alimentos comprende:

- Monitoreo microbiológico de ingredientes y alimentos.
- Eliminación de fuentes de contaminación en los sitios de elaboración.
- Reforzamiento de las medidas higiénicas en los puntos de venta.
- Recomendaciones a pacientes inmunocomprometidos, ancianos y mujeres gestantes para que eviten el consumo de ciertos alimentos y que consulten a su médico en caso de presentar síntomas sugerentes de listeriosis.
- Concientización de los procesadores de alimentos y sus empleados mediante programas de entrenamiento en higiene de alimentos.
- Introducción del sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control (HACCP) en las plantas elaboradoras de alimentos.

Aplicando esta serie de medidas, en Francia se logró reducir en un 68% la incidencia de listeriosis humana (Goulet *et al.*, 2001). La mayor parte de esta reducción se relaciona con la introducción progresiva de medidas preventivas en la industria de alimentos pues, al igual que en EUA (Tappero *et al.*, 1995) en Francia se encontró una relación temporal entre: medidas preventivas en industria de alimentos, reducción de alimentos contaminados con *L. monocytogenes* y disminución de la incidencia de listeriosis humana (Goulet *et al.*, 2001).

Si bien en otros países se ha investigado la presencia de *Listeria* en fábricas de productos lácteos de tipo industrial (Cox *et al.*, 1989; Klausner y Donnelly, 1991; Jacquet *et al.*, 1993; Pritchard *et al.*, 1994), al menos en nuestro país se carece de información sobre la contaminación con *Listeria* de alimentos elaborados en forma artesanal. La elaboración artesanal y el consumo de quesos frescos son actividades frecuentes en poblaciones del estado de Jalisco. La elevada frecuencia de contaminación con *Listeria* encontrada en quesos ranchero y panela que se expenden en mercados de Guadalajara (Luis Juan Morales *et al.*, 1992a y 1992b; Luis Juan Morales 1994) hacen necesario identificar los sitios donde ocurre la contaminación de estos alimentos con *Listeria* para establecer medidas que permitan su reducción o eliminación de estos sitios, pues al tener nichos ecológicos y características fisiológicas comunes, la detección de otras especies de *Listeria* puede ser un indicador de riesgo de contaminación con *L. monocytogenes* (Ryser, 1999b) y por ende riesgo de listeriosis.

Esta investigación se ubica dentro de las actividades de relacionadas con la inocuidad de alimentos, área que de acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud es competencia de la Salud Pública Veterinaria (Ruiz y Estupiñan, 1992; OPS, 2002).

HIPÓTESIS

Las condiciones en que se realiza la producción artesanal de quesos frescos permiten que se generen fuentes de *Listeria* que se perpetúan y a partir de ellas y por diversos mecanismos, el microorganismo contamina el producto.

OBJETIVOS

General

Determinar la participación de las queserías artesanales en la contaminación con *Listeria* de los quesos frescos.

Específicos

- 1.- Determinar las fuentes y mecanismos que intervienen en la contaminación con *Listeria* durante la elaboración artesanal de quesos frescos.
- 2.- Identificar los puntos críticos para el control de *Listeria* durante la elaboración artesanal de quesos frescos.

II. METODOLOGÍA

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

Selección de las queserías artesanales

En un estudio previo (Luis Juan Morales, 1994) se identificó un municipio de Zapotlanejo, Jalisco, de donde procedían quesos positivos a *Listeria* que se vendían en mercados de Guadalajara, Jal. Del 10 de febrero al 6 de marzo de 1997 se realizó una encuesta en esa población para investigar la ubicación de queserías artesanales y los procedimientos de elaboración utilizados. El total de casas fue de 472, durante la encuesta, 115 se encontraban deshabitadas, en 170 (36%) aceptaron saber hacer queso y en 58 (12%) se dedicaban a la elaboración artesanal de queso (queserías). De acuerdo con los datos proporcionados en 24 queserías, el rango de leche procesada osciló de 20 - 800 litros/ día, con una moda de 300 litros/día. En esta población se considera que obtienen un 1 kg. de queso a partir de 10 litros de leche, de donde se establece que el volumen de queso producido oscila entre 2 - 80 kg. por quesería. A partir de las observaciones realizadas durante la encuesta, se eligieron 4 queserías, que designamos con las letras A, B, C, y D. Las instalaciones, equipo, personal y procesos de elaboración (Cuadro 6 y Fig. 3) de las queserías seleccionadas fueron representativas de las queserías de esa población, además, la distancia mínima entre las queserías participantes fue de 400 metros y ni los propietarios ni los proveedores de leche tenían relación con otra de las queserías seleccionadas.

Período de muestreo y muestras recolectadas

Del 10 febrero de 1999 al 9 de octubre del 2000 se realizaron 48 visitas a las queserías; entre 11 - 15 visitas por quesería, con el fin de observar los procesos de elaboración de los quesos y, recolectar muestras de los ingredientes, cuajadas, equipos y superficies empleadas, enseres de limpieza y de los quesos producidos.

Cuadro 6. Características de las queserías artesanales en un municipio de Zapotlanejo, Jal.

Personal	<ul style="list-style-type: none"> • El propietario y/o sus familiares se encargan de elaborar el queso, cuando así lo requieren contratan de 1-5 empleados, generalmente mujeres. • El personal realiza mas de una actividad durante el proceso de elaboración. • Generalmente el propietario se encarga de vender el queso en tianguis o de distribuirlo en mercados de la zona metropolitana de Guadalajara. • No existen labores o procedimientos que requieran de personal o maquinaria especializada.
Instalaciones	<p>Cuarto y/o corredor anexo o dentro de la casa del quesero, provisto de :</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mesas de madera y pretilas de cemento (liso) con frecuencia recubierto de azulejo o fibra de vidrio • Cilindro de gas • Lavadero
Equipo	<ul style="list-style-type: none"> • Tinas y botes de plástico o fibra de vidrio, de diferentes capacidades, empleados para cuajar la leche. • Baldes o pequeños recipientes de plástico para extraer y transportar suero. • Palas de madera, coladeras y cucharas de metal propias de cocinas domésticas • Costales de tela para filtrar la leche • Cuadros de tela para moldear queso adobera • Chiquihuites de "carrizo" de 25 a 33 cm de diámetro . • Costales de plástico para escurrir cuajadas de queso fresco y adobera • Molino de mano con adaptación para un motor de ¼ hp. o un pequeño molino de carnicería para moler la cuajada. • Quemadores de gas y cazos para la obtención de requesón <ul style="list-style-type: none"> • Moldes de pequeñas dimensiones acordes a los diferentes tipos de queso que se elaboran: <ol style="list-style-type: none"> 1. Aros de metal de 7.5 a 13.5 cm de diámetro y 2 a 4.5 cm de altura, para la elaboración de queso rancho. 2. Rectángulos de madera ;largo: 12-15 cm x 10 cm de ancho x 7.5 - 10 cm de alto, para la elaboración de queso adobera 3. Canastos de "otate" o "carrizo" de 10 - 17 cm de diámetro, para la elaboración de panela. • Refrigeradores o una pequeña cámara de refrigeración. • Cepillos de fibra vegetal (escobetas) o de plástico y Escoba o cepillo grande de plástico para la limpieza.

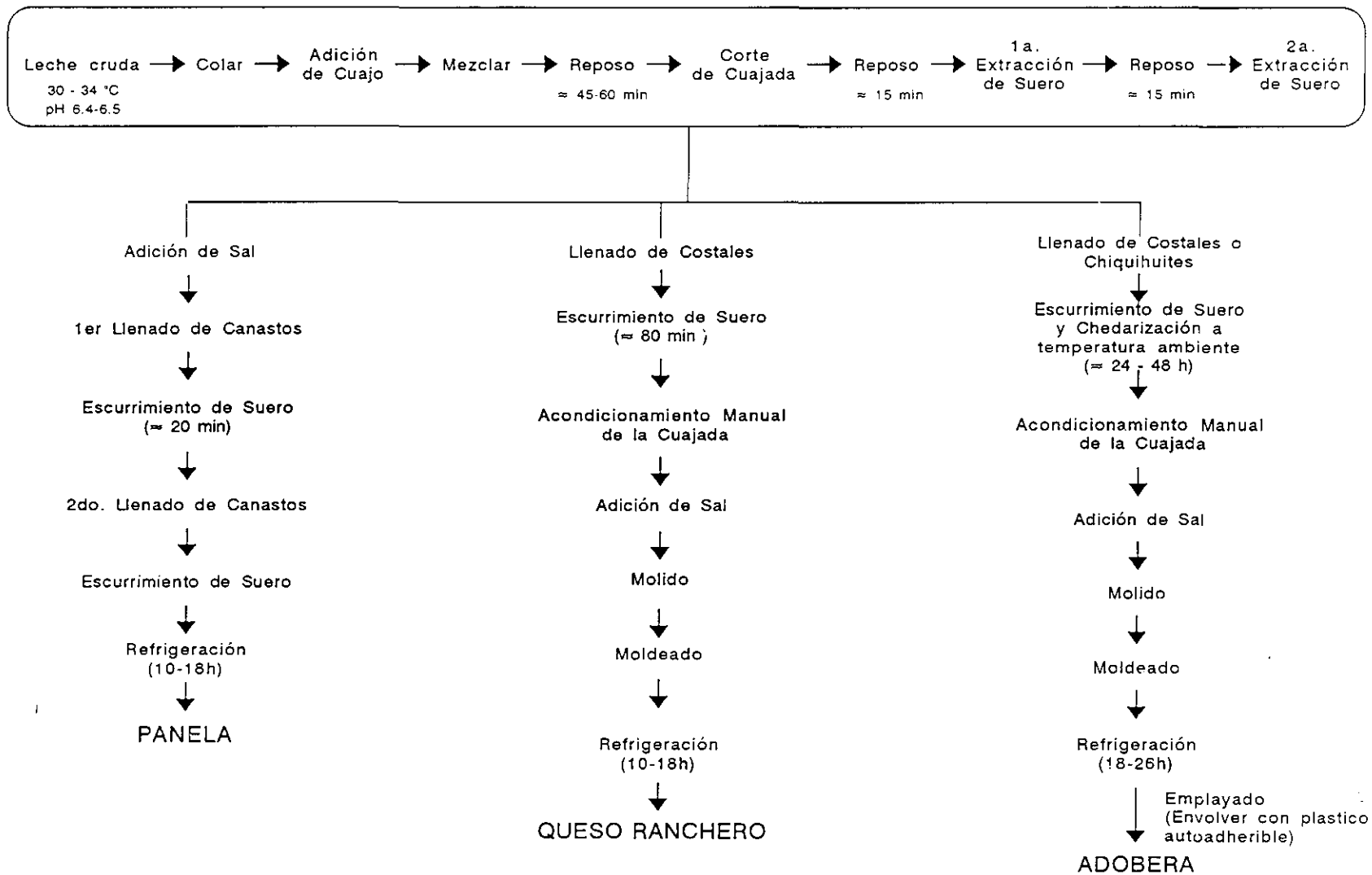


Figura 3. Diagrama de elaboración artesanal de quesos Panela, Fresco y Adobera.

En cada quesería se muestrearon de 23 a 24 puntos distintos (Cuadros 7 y 9) y cada punto fue muestreado en 3-4 ocasiones, colectándose un total de 379 muestras (92-95 muestras por quesería). El intervalo de muestreo de un mismo punto fue generalmente de un mes, aunque en algunos casos este intervalo fue distinto debido a que el punto a muestrear no estaba disponible el día en que se iba a recolectar la muestra.

Las muestras de leche se tomaron de una muestra compuesta (*pool*) de 4 - 10 litros que incluía al menos medio litro de leche de cada una de las cántaras en que llegaba la leche a las queserías. Del *pool*, se tomaron 2 submuestras: una de 250 ml (a) y otra (b) consistente en una torunda de Moore (Wells *et al.*, 1971) por la cual se filtró el *pool* restante después de haber tomado la muestra (a); restando el peso inicial de la torunda -13.5 g- el peso de la torunda después de filtrar la leche fue de 42 - 80 g. El procedimiento de filtrar la leche a través de la torunda se realizó para tener mayores oportunidades de aislar *Listeria* a partir de leche, considerando que este procedimiento se ha reportado como mas sensible para el aislamiento de *Salmonella* en leche (Wells *et al.*, 1971). La torunda se analizó de igual forma que la muestra (a).

Las muestras de equipos y superficies se tomaron empleando gasas (10 x 10 cm con 4 capas) humedecidas con diluyente de peptona (peptona de caseína al 0.1%). Se empleó una gasa por cada 200 cm², la cual se humedeció solo cuando las superficies a muestrear se encontraban secas. Para el muestreo de manos, se utilizó una gasa seca por persona, pues, en todas las ocasiones, las manos se encontraban húmedas. Generalmente las telas para colar la leche y moldear el queso adobera se humedecían antes de su uso, por esta razón, en cada quesería se recolectaron de esos puntos 2 telas secas y 2 húmedas, excepto en la quesería D, donde no humedecían el costal para filtrar la leche.

Las muestras de quesos se obtuvieron a partir de un *pool* de rebanadas de 4 - 8 piezas de queso. Las queserías elaboraban quesos de distintos tamaños, por lo que el peso de las piezas osciló entre 150 - 1,400 g, dependiendo del tipo de queso. El volumen de muestra compuesta se estableció eligiendo el criterio señalado por la ICMSF (International Commission for Microbiological Specifications for Foods: Comisión Internacional para Especificaciones Microbiológicas de Alimentos) con relación a planes

de muestreo de *Listeria* en productos lácteos que corresponde a la categoría 14: " El microorganismo implica un daño severo a la salud y las condiciones bajo las cuales se espera sea manejado y consumido el alimento después del muestreo, no cambia la importancia del riesgo" (Grace *et al.*,1992). Bajo esta categoría, se recomienda que el volumen de la muestra compuesta sea de 750 g de producto, esto se redondeó a 800 g para manejar piezas completas de queso y porciones mínimas de 100 g.

Análisis microbiológico de las muestras

Las muestras fueron transportadas y mantenidas en refrigeración hasta su análisis, dentro de las 24 h posteriores a su recolección.

Prueba de inhibidores

A partir de la muestra con 250 ml de leche se realizó la prueba BSDA (*Bacillus stearothermophilus* Disk Assay) para la detección de inhibidores microbianos en leche (Maturin, 1995) (Fig. 4).

Aislamiento e identificación de *Listeria*

El procedimiento seguido para el aislamiento e identificación de *Listeria* en queserías artesanales (Fig. 5 y Cuadro 8), se diseñó con base a los esquemas propuestos por la FDA en 1987 y 1995, así como el propuesto por el USDA en 1989. Se utilizó el caldo de enriquecimiento propuesto por la FDA en 1988, los medios de aislamiento recomendados por el USDA en 1989 y se siguió el esquema de identificación a nivel de género y especie propuesto por la FDA en 1995 (Lovett, 1988; Kornacki *et al.*, 1993; Hitchins, 1995). Se seleccionaron 1-6 colonias sospechosas en los medios de aislamiento empleados: Agar Feniletanol-Cloruro de Litio-Moxalactam (LPM) y Medio de Oxford Modificado (MOX). La concentración de cloruro de litio del MOX se disminuyó a 10g/litro pues a la concentración recomendada (15g/litro. Ryser y Marth, 1999) se observó que el medio era inhibitorio para algunas cepas de *Listeria*. De los aislamientos identificados como *L. monocytogenes*, se seleccionó un aislamiento de cada muestra para su tipificación serológica, la cual fue realizada por personal del Instituto Pasteur en París, Francia.

Cuadro 7. Muestras recolectadas en queserías artesanales.

CATEGORÍA	MUESTRA	MOMENTO DE MUESTREO	VOLUMEN COLECTADO/SUPERFICIE MUESTREADA
INGREDIENTES	Leche	En cántaras al momento de llegar a la quesería	½ a 1 litro por cántara formándose un pool de 4 - 10.5 litros del cuál : a) se colectaron 250 ml y b) Se filtró la leche restante a través de una torunda de Moore
	Cuajo	Contenido de la botella que se utilizó para cuajar el día del muestreo	50 ml
CUAJADAS	Cuajada para Panela y Queso Ranchero	En tinas, antes de llenar canastos o pasar a costal	250 g
	Cuajada para Queso Adobera	En costal, antes del acondicionamiento manual	250 g
PRODUCTOS	Panela	Producto refrigerado listo para su venta	Rebanadas de 6-8 quesos, tomando al menos un queso de cada tipo de presentación (400 - 1200 g). Peso de la muestra compuesta : 800 g
	Queso Ranchero	Producto refrigerado listo para su venta	Rebanadas de 8 quesos, tomando al menos un queso de cada tipo de presentación (100 - 400 g). Peso de la muestra compuesta: 800 g
	Queso Adobera	Producto refrigerado listo para su venta	Rebanadas de 8 quesos, tomando al menos un queso de cada tipo de presentación (500 - 1600 g). Peso de la muestra compuesta: 800 g

Continúa...

EQUIPO			
	Costal para colar leche	Seco al Inicio de jornada (2 costales en queserías A, B y C; 4 costales en quesería D). 2 Húmedos antes de emplearse en queserías A,B, y C.	27 - 43 cm ²
	Tela para moldear queso	2 Secas al inicio de jornada 2 Húmedas antes de emplearse	13 - 320 cm ²
	Recipientes para cuajar	Inicio de jornada	5, 500 cm ² - 9, 700 cm ² : Fondo de 1-5 recipientes con diámetros de 35 a 100 cm. 1 gasa por cada recipiente.
	Mezclador (Palita de madera)	Inicio de jornada	60 - 300 cm ² : 1-2 gasas.
	Equipo para Extracción de Suero	Inicio de jornada	~ 200 - 1200 cm ² : Superficies internas y externas de recipientes y coladeras. 1-4 gasas.
	Costales para Cuajada	Secos, al inicio de jornada	1.5 -4.5 m ² , dependiendo de las dimensiones interiores de 1-3 costales. 2-5 gasas.
	Molino	Inicio de jornada	Interior de 1 molino, superficie sin determinar. 1-2 gasas
	Moldes de Madera	Inicio de jornada	3, 500 cm ² : Interior de 8 moldes, muestreando 2-4 moldes de cada tamaño. 1 gasa para 2 moldes.
	Moldes de Metal	Inicio de jornada	200 - 400 cm ² : Interior de 2-3 moldes. 1 gasa por molde

Continúa....

	Canastos Panela	Antes de llenar con cuajada	800 -1200 cm ² : Fondo de 8 canastos con diámetros de 10.5 -17 cm. 1 gasa para 2 moldes.
	Chiquihuite	Inicio de jornada	500- 1800 cm ² : Fondo de 1-3 canastos con diámetros de 25- 35 cm.
SUPERFICIES EN CONTACTO CON LOS PRODUCTOS	Superficies empleadas para Elaboración de Productos Refrigerador	Inicio de jornada	1000 cm ² . 1 gasa por cada 200 cm ²
		Inicio de jornada	1000 cm ² : Anaqueles, Parrillas y Cajas conteniendo productos.
	Manos del Personal	Durante la manipulación de cuajadas y productos.	1-5 gasas: 1 gasa por persona para ambas manos
Piso	Pisos del área de elaboración y de cámara de refrigeración	Antes del inicio de jornada	1000 cm ² : 500 cm ² de coladeras, 250 cm ² del área de elaboración y 250 cm ² del área de refrigeración. 1 gasa por cada 200 cm ² .
ENSERES DE LIMPIEZA	Escobeta o Cepillo para limpieza de canastos y superficies	Inicio de jornada	1-3 gasas: 1 gasa por escobeta o cepillo
	Escoba	Inicio de jornada	1-2 gasas: 1 gasa por escoba

DETECCIÓN DE INHIBIDORES EN LECHE
Método cualitativo con disco de papel filtro empleando *Bacillus stearothermophilus*

PROCEDIMIENTO

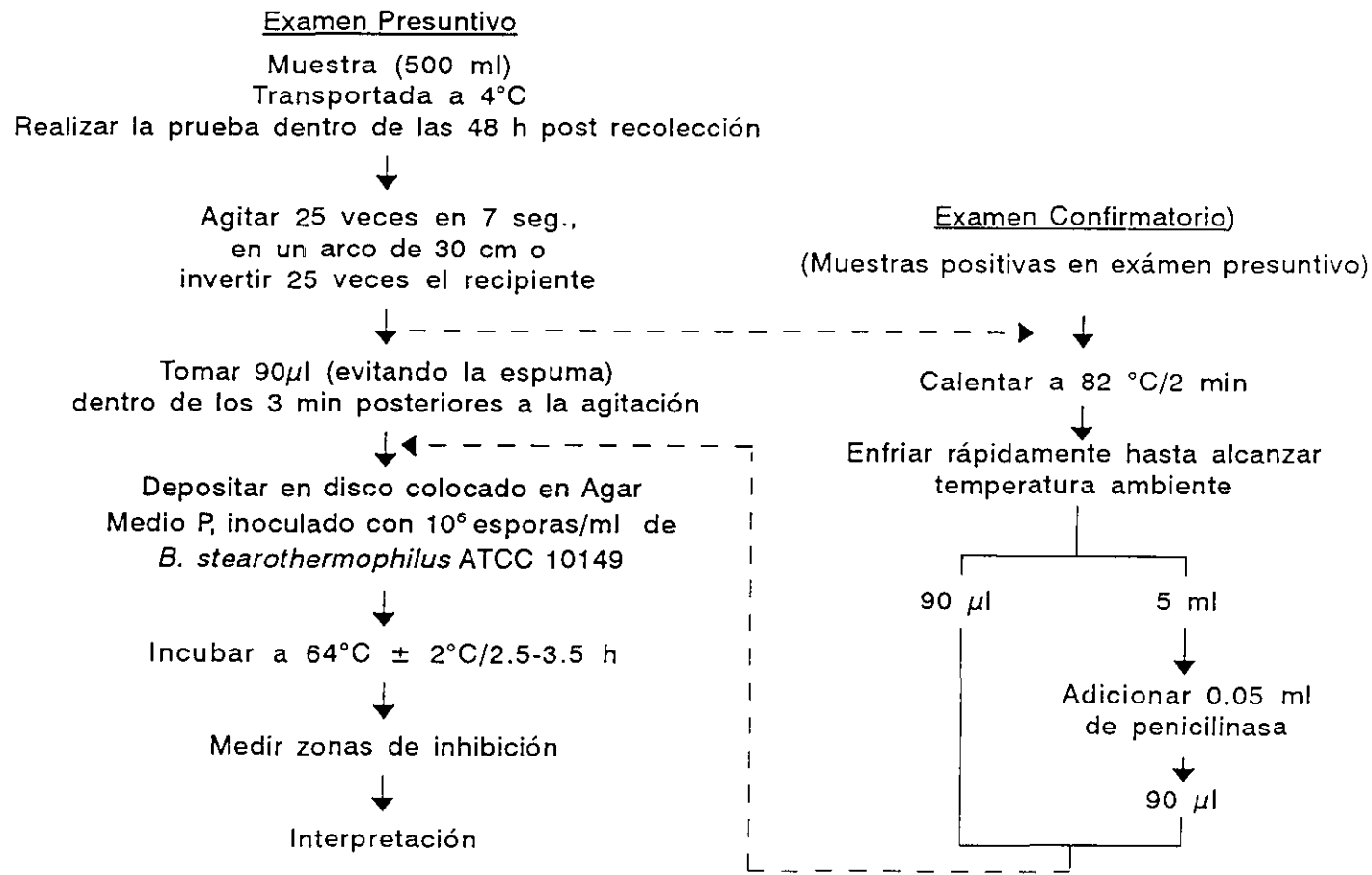


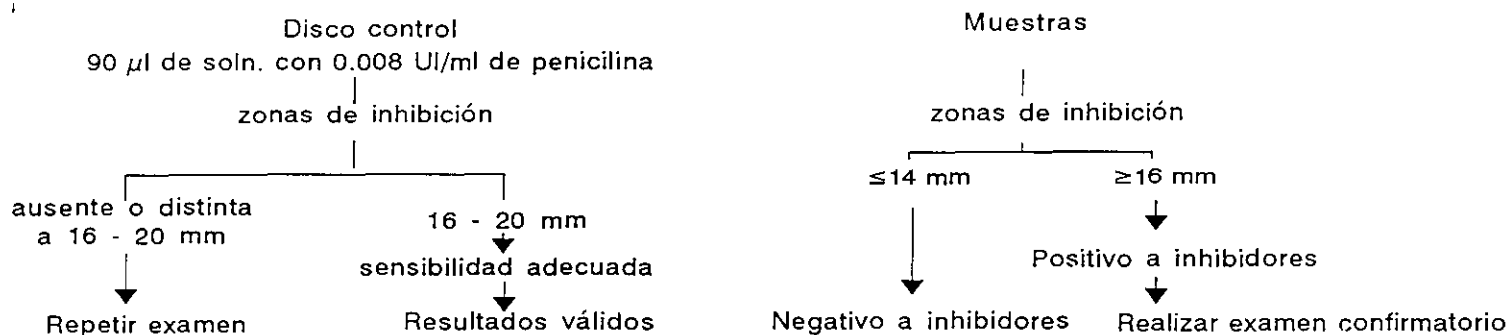
Figura 4. Detección de inhibidores microbianos en leche (Bishop *et al.*, 1992; Maturin, 1995.)

DETECCIÓN DE INHIBIDORES EN LECHE

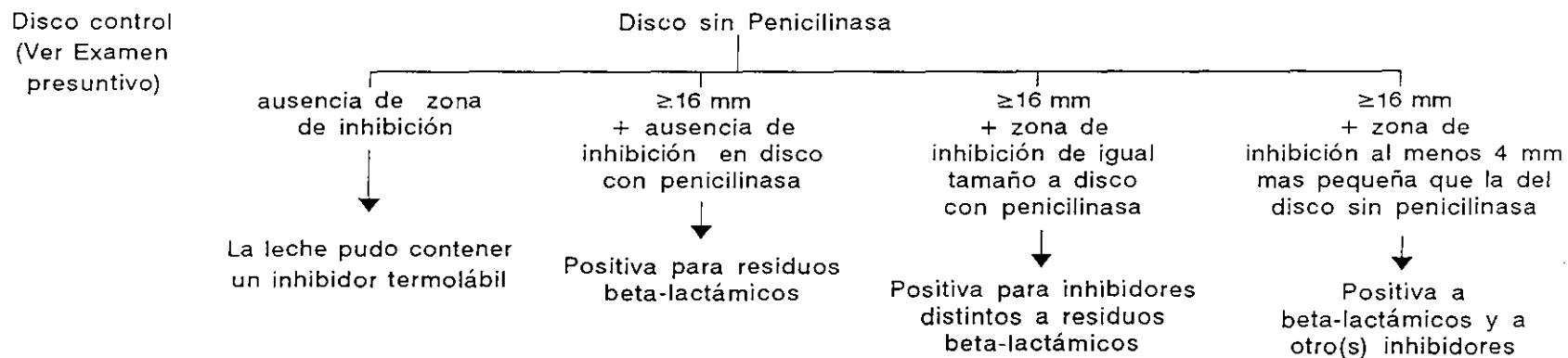
Método cualitativo con disco de papel filtro empleando *Bacillus stearothermophilus*

INTERPRETACIÓN

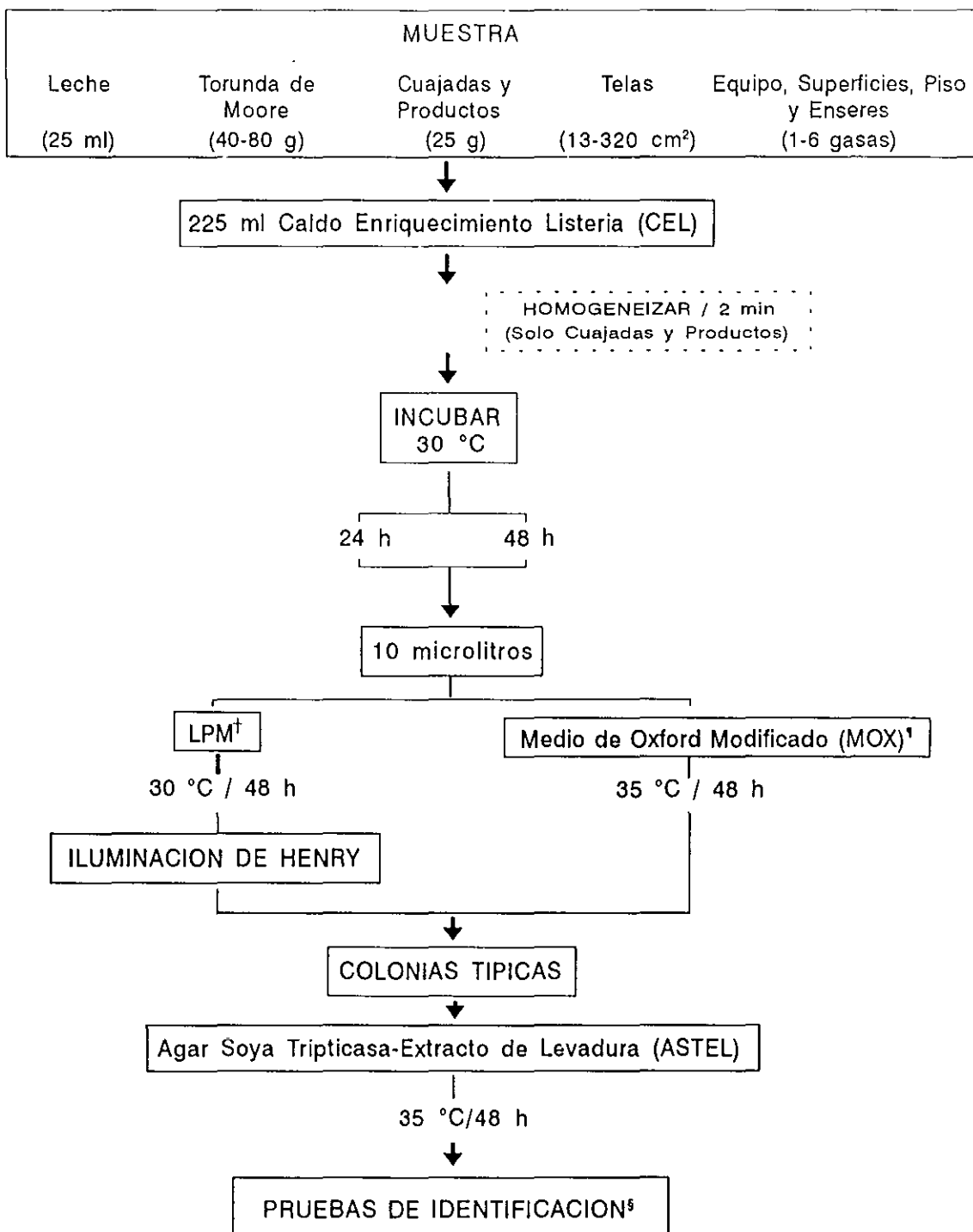
Examen Presuntivo



Examen Confirmatorio



Continuación...Figura 4. Detección de inhibidores microbianos en leche (Bishop *et al.*, 1992; Maturin, 1995).



† LPM = Agar Feniletanol-Cloruro de Litio-Moxalactam.

‡ Se modificó la concentración de Cloruro de Litio de este medio. Se preparó con 10 g/litro en lugar de 15 g/litro indicado por Ryser y Marth.: Listeria, Listeriosis and Food Safety.199

§De acuerdo con las recomendaciones de Hitchins, 1995, FDA Bacteriological Analytical Manual, 7th Edition. A.O.A.C., Arlington, VA.

Figura 5. Técnica para el aislamiento de *Listeria* en queserías artesanales.

Cuadro 8. Pruebas empleadas para la identificación de *Listeria* a nivel de género y especie.

Prueba	Especie						
	<i>monocytogenes</i>	<i>ivanovii</i>	<i>innocua</i>	<i>welshimeri</i>	<i>seeligeri</i>	<i>grayi</i>	
Identificación de Género	Iluminación de Henry	+	+	+	+	+	+
	Catalasa	+	+	+	+	+	+
	Gram (KOH 3%)	+	+	+	+	+	+
	Morfología microscópica†	+	+	+	+	+	+
	Movilidad en SIM	+	+	+	+	+	+
	Hidrólisis de Esculina	+	+	+	+	+	+
	Fermentación de carbohidratos						
	Glucosa	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	
Diferenciación de especies	Manitol	-	-	-	-	-	+
	Ramnosa	+	-	V [‡]	V	-	V
	Xilosa	-	+	-	+	+	-
	Hemólisis β [§]	+	+	-	-	+	-
	CAMP						
	<i>S. aureus</i>	+	-	-	-	+	ND [¶]
	<i>R. equi</i>	-	+	-	-	-	ND
	Reducción de nitratos	-	-	-	-	-	V

†Bacilos cortos regulares de extremos redondeados, algunas veces casi cocoides; solos, en cadenas cortas, en empalizada o agrupaciones en formas V, Y. (Rocourt, 1999)

‡ Variable § Picadura en sangre de ovino Ø No determinado. Fuente: Adaptada de Hitchins, 1995.

III. RESULTADOS

Globales

Listeria fue aislada en 113 (30 %) de las 379 muestras recolectadas (Figura 6), 22 de los 24 puntos estudiados fueron positivos al menos en una ocasión (Cuadro 9). No se aisló *Listeria* de las muestras de leche y cuajo. Solo una muestra de leche, de la quesería C, fue positiva a inhibidores microbianos, tratándose de inhibidores termolábiles, aparentemente en pequeña cantidad (halo de 15 mm). Ninguna muestra fue positiva a residuos antimicrobianos.

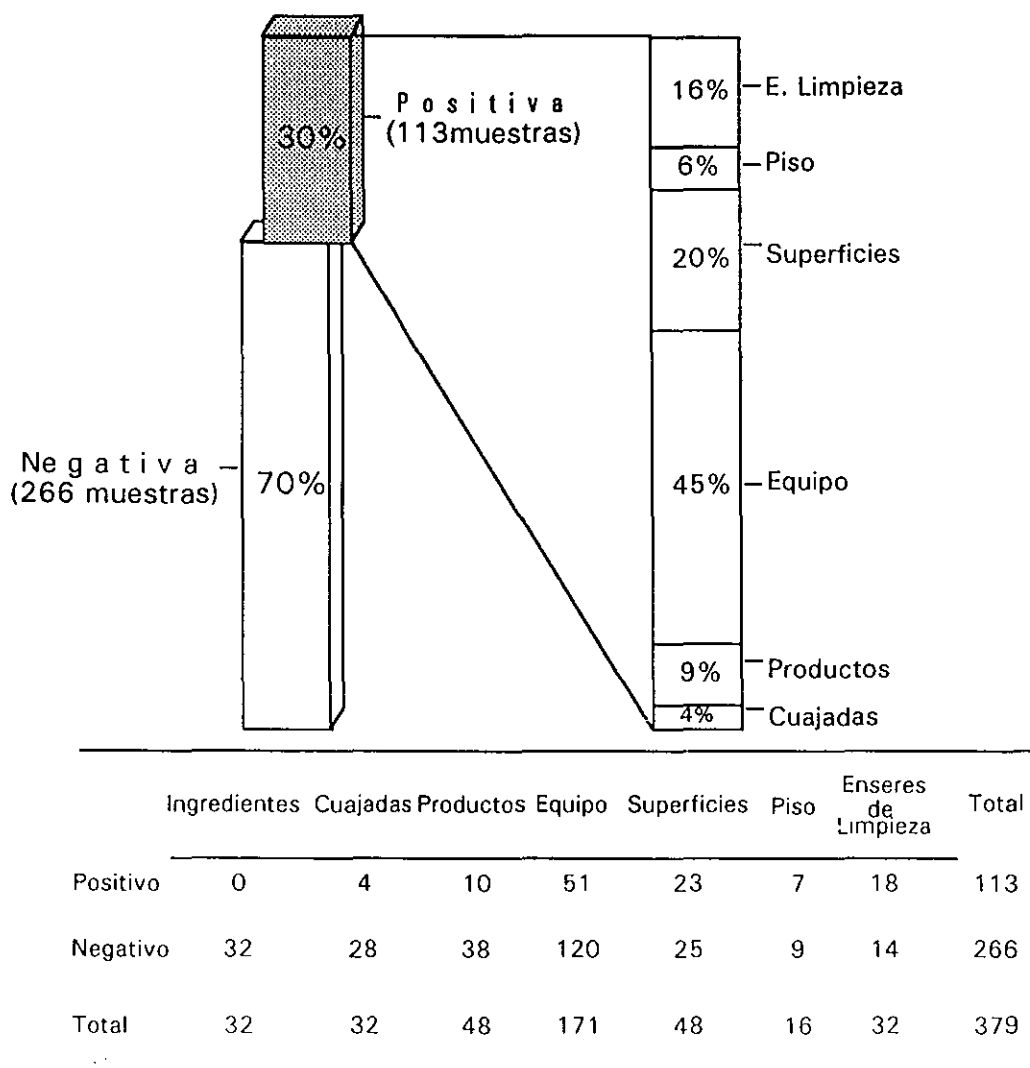


Figura 6. Frecuencia de *Listeria* en queserías según categoría de muestra.

Las marcas de cuajo utilizadas en las queserías fueron "Guadmex" e "Imperial"; de acuerdo con la etiqueta de los fabricantes, este ingrediente contiene: agua, sal yodatada, alcohol etílico, popilenglicol, enzima proteolítica proveniente del cuarto estómago de ternera, 1.9 % de propionato de sodio y 0.1 % de benzoato de sodio.

Las muestras con mayor frecuencia de aislamiento de *Listeria* fueron: la escoba, el refrigerador, el chiquihuite, los recipientes para cuajar y las superficies donde se elaboran los quesos (Cuadro 9).

Cuadro 9. Muestras positivas a *Listeria* en queserías, según tipo de muestra y quesería.

CATEGORÍA	TIPO DE MUESTRA	MUESTRAS POSITIVAS Quesería				TOTAL Positivas/ Estudiadas
		A	B	C	D	
Ingredientes	Leche	0	0	0	0	0/16
	Cuajo	0	0	0	0	0/16
Cuajadas	Cuajada para Panela y Queso Ranchero	1	0	0	1	2/16
	Cuajada para Queso Adobera	2	0	0	0	2/16
Productos	Queso Ranchero	1	0	0	0	1/16
	Queso Adobera	3	0	0	0	3/16
	Panela	3	0	3	0	6/16
Equipo	Costal para estilar cuajada	NE [†]	0	1	0	1/12
	Mezclador	0	2 [§]	0	0	2/15
	Moldes de madera	2	0	0	0	2/16
	Moldes de metal	1	1	0	0	2/16
	Tela para moldear queso	2	1	1	0	4/16
	Costal para colar leche	2	1	2	0	5/16
	Molino	4	0	1	0	5/16
	Canastos para panela	3	1	2	0	6/16
	Equipo para extracción de suero	4	3	0	0	7/16
	Recipientes para cuajar	1	4	2	1	8/16
Superficies	Chiquihuite	4	3	2	0	9/16
	Manos	1	0	2	1	4/16
	Superficies empleadas para elaboración de productos	4	3	1	0	8/16
Refrigerador	Refrigerador	3	2	4	2	11/16
	Piso	1	4	1	1	7/16
Enseres de limpieza	Pisos del área de elaboración y de cámara de refrigeración	1	4	1	1	7/16
	Escobeta o cepillo para limpieza de canastos y superficies	4	2	0	0	6/16
Escoba	4	4	3	1	12/16	
TOTAL Positivas/Estudiadas		50/92	31/95	25/96	7/96	113/379

† De cada tipo de muestra se colectaron 4 muestras en cada quesería excepto lo señalado en los símbolos † . † Sólo 3 muestras. § No Existe.

Las muestras de los recipientes para cuajar, refrigerador, escoba y piso, fueron positivas en las 4 queserías (Cuadros 9, 15, 16, 17 y 18).

Especies aisladas y productividad de los medios de aislamiento

Las especies de *Listeria* aisladas fueron: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii*; predominando los aislamientos de *L. monocytogenes* y *L. innocua* (Cuadro 10).

Cuadro 10. Frecuencia de aislamientos de especies de *Listeria* en queserías.

Especie	Aislamientos
<i>L. monocytogenes</i>	68
<i>L. innocua</i>	52
<i>L. welshimeri</i>	14
<i>L. ivanovii</i>	1
<i>Listeria</i> spp.	2
Total	137 [†]

† No coincide con el total de muestras positivas, porque en algunas muestras se aisló mas de una especie.

La productividad de los medios de aislamiento empleados se presenta en los cuadros 11 y 12. La mejor recuperación de *Listeria* a partir de las muestras estudiadas se obtuvo en el agar LPM a partir del Caldo de Enriquecimiento con 48 h de incubación.

Tanto por el agar LPM como por el agar MOX, fue posible aislar *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. welshimeri*, con mayor número de aislamientos en el agar LPM; el único aislamiento de *L. ivanovii* se obtuvo en el agar MOX (Cuadro 12). Hubo 2 aislamientos obtenidos en el agar LPM cuya identificación a nivel de especie no fue posible por haber sido dudosas las pruebas de CAMP con *S. aureus* y la de fermentación de xilosa, posiblemente fueran *L. seeligeri* o *welshimeri*.

Cuadro 11. Productividad de los medios de aislamiento según tiempo de incubación del medio de enriquecimiento y quesería.

Fábrica	Agar LPM [†]		Agar MOX [‡]	
	CEL [§] 24h	CEL 48 h	CEL 24 h	CEL 48 h
A (50 muestras positivas)	31 [∅]	48	24	35
B (31 muestras positivas)	23	30	24	29
C (25 muestras positivas)	14	23	15	20
D (7 muestras positivas)	5	7	5	6

† Agar Feniletanol-Cloruro de Litio-Moxalactam.

‡ Agar Medio de Oxford Modificado

§ Caldo de Enriquecimiento para *Listeria* incubado a 30°C por 24 h y 48 h.

∅ Muestras positivas obtenidas por esta vía de aislamiento.

Cuadro 12. Aislamientos de especies de *Listeria* según medio empleado y quesería.

Quesería	LPM [†]				MOX [‡]			
	<i>L. m</i> [§]	<i>L. inn</i>	<i>L. w</i>	<i>L. spp.</i>	<i>L. m</i>	<i>L. inn</i>	<i>L. w</i>	<i>L. iv</i>
A	47	5	2	0	34	5	1	0
B	0	31	0	0	0	29	0	0
C	18	6	10	2	20	5	5	1
D	0	7	1	0	0	5	1	0
Total	65	49	13	2	54	44	7	1

† Agar Feniletanol-Cloruro de Litio-Moxalactam.

‡ Agar Medio de Oxford Modificado

§ *L. m* : *L. monocytogenes*. *L. inn*: *L. innocua*. *L. w*: *L. welshimeri*. *L. iv*: *L. ivanovii*.

Ciclo de producción y prácticas observadas en queserías

La producción de quesos en las queserías implica un ciclo de actividades que se llevan a cabo en dos turnos durante los 7 días de la semana (Cuadro 13) las visitas para observación y recolección de muestras se llevaron a cabo durante la jornada matutina, en todas las queserías se realizó al menos una visita en cada uno de los distintos días de la semana para ver si existían prácticas que se llevaran a cabo en determinados días. Durante las visitas realizadas a las queserías se observaron al menos en una ocasión, una serie de situaciones y prácticas de limpieza enlistadas en el Cuadro 14 que en su mayoría ocurrieron en las 4 queserías visitadas que sirven de base para establecer las formas en que pueden ocurrir contaminaciones durante la elaboración y almacenamiento de los quesos en las queserías.

Cuadro 13. Ciclo de producción en queserías.

Hora	Actividades	
9 - 11 h	Recepción y cuajado de leche	Limpieza inicio de jornada
11 - 15 h	Elaboración de: Panela, Queso Ranchero y Requesón. Preparación de cuajada para Queso Adobera. Molienda y moldeo de Queso Adobera	
11 - 17 h		Retorno de vendedores y producto no vendido
14 - 17 h		Limpieza y fin de jornada matutina
17 - 20 h	Envoltura con plástico autoadherible (employado) de Queso Adobera	
18 - 20 h	Recepción y cuajada de leche	
20 - 24 h	Elaboración de Panela, Requesón y Queso Asadero †	Posiblemente, lavado de recipientes para cuajar
4 - 7 h	Envío de quesos a Guadalajara	

† Queserías A y C

Cuadro 14. Situaciones y prácticas observadas en queserías.

Situación o Práctica	Quesería			
	A	B	C	D
Ingreso de lecheros hasta el área de proceso	•	•	•	•
Enjuagado de cántaras en área de proceso	•	•	•	•
Residuos de agua en el interior de los recipientes para cuajar después de haber sido lavados	•	•	•	•
Contacto de los bordes y del interior de los recipientes para cuajar con el piso o con el fondo externo de otros recipientes	•	•	•	•
Equipo para extracción de suero en contacto con el piso	•	•	•	•
Personal alternando operaciones de limpieza con manipulación de cuajadas sin una adecuada higienización de las manos	•		•	•
Manipulación de cuajadas después de tocar el fondo externo de recipientes para cuajar	•	•	•	•
Contacto de cuajada con parte externa de canastos y chiquihuites	•	•	•	•
Residuos de suero, cuajadas en superficies y equipo	•	•	•	•
Residuos de queso en refrigeradores	•	•	•	•
Contacto de quesos con superficies del refrigerador o con el fondo externo de las cajas empleadas en el almacenamiento en refrigeración	•	•	•	•
Encharcamiento agua-leche-suero en área de proceso	•	•	•	•
Encharcamiento de agua y/o suero en refrigeradores	•	•	•	•
Goteo de condensadores en cámaras de refrigeración	•	•	•	•
Empleo de los mismos enseres de limpieza en áreas de proceso y de refrigeración	•	•	•	•
Parrillas en contacto con pasto durante la limpieza del refrigerador	•			
Anaqueles de madera en contacto con el piso durante la limpieza de la cámara de refrigeración			•	
Rejillas de drenaje abiertas en área de proceso	•	•	•	•
Presencia de animales cerca del área de proceso		•	•	
Introducción con la escoba de polvo del exterior al área de proceso	•	•		

Continúa...

Continuación....Cuadro 14. Situaciones y prácticas observadas en queserías .

Situación o Práctica	Quesería			
	A	B	C	D
Tratamiento térmico (Agua caliente > 70 °C/27 minutos) a canastos para panela dos veces por semana (cada tercer día)				•
Aplicación de suero caliente (90°C) a chiquihuites y mantas antes de depositar en ellos requesón				•
Cepillado de cámara de refrigeración, empleando agua y jabón, 2 veces por semana (cada tercer día)				•
Lavado diario de telas con agua y jabón		•		•
Inmersión de costales y moldes en agua o suero caliente				•
Lavado de costales con agua y jabón		•		•
Enjuague con agua de las superficies para elaboración del queso al inicio y fin de la jornada matutina	•	•	•	
Cepillado y enjuague con agua (ocasionalmente también con jabón) de superficies para elaboración de queso al inicio y fin de la jornada matutina				•
Vaciado al drenaje, de agua o suero caliente al menos 1 vez al día				•

†Práctica observada al menos una vez en la quesería.

Quesería A

De las 92 muestras recolectadas, 50 (54%) fueron positivas a *Listeria*, 20 de los 23 puntos muestreados, fueron positivos al menos en una ocasión (Cuadros 9 y 15); en esta quesería no emplean costales para estilar la cuajada, sino que la colocaban directamente en los chiquihuites. Las especies aisladas fueron: *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. welshimeri*. *Listeria monocytogenes* fue aislada de 48 muestras y de todos los puntos que fueron positivos en esta quesería. *Listeria innocua* se aisló de 7 muestras, 4 de ellas conjuntamente con *L. monocytogenes* y en 2 como única especie. Los puntos de donde se aisló *L. monocytogenes* fueron: escoba, pisos, escobetas y chiquihuite. *Listeria welshimeri* se aisló conjuntamente con *L. monocytogenes* a partir del costal para colar la leche y del molino en la misma visita. Los serotipos de *L. monocytogenes* presentes en esta quesería fueron: 4b, 1/2 inmóvil, 1/2a, y 1/2b encontrados en 1, 2, 7 y 38 muestras, respectivamente (Cuadro 15).

Cuadro 15. Especies y serotipos de *Listeria* aislados de la quesería A según muestra y fecha de muestreo.

Muestra	Fecha							
	08-02-99 (0) [†]	23 - 04- 99 (2)	07-06-99 (4)	10-09-99 (6)	29-11-99 (9)	21-02-00 (12)	12-09-00 (19)	9-10-00 (20)
Cuajada para Panela y Queso Ranchero			<i>L.m.</i> 1/2b [‡]					
Cuajada para Queso Adobera			<i>L.m.</i> 1/2a					<i>L.m.</i> 1/2b
Panela	<i>L.m.</i> 1/2a	<i>L.m.</i> 1/2a	<i>L.m.</i> 1/2b					
Queso Ranchero							<i>L.m.</i> 1/2b	
Queso Adobera			<i>L.m.</i> 1/2b			<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b	
Costal para colar leche (húmedo)				<i>L.m.</i> 1/2b <i>L.welshimeri</i>	<i>L.m.</i> 1/2b			
Tela para moldear queso (húmeda)						<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 4d	
Recipientes para cuajar		<i>L.m.</i> 1/2b						
Equipo para extracción de suero		<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b		<i>L.m.</i> 1/2b		<i>L.m.</i> 1/2b	
Molino	<i>L.m.</i> 1/2a	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b <i>L.welshimeri</i>				
Moldes de madera		<i>L.m.</i> 1/2a		<i>L.m.</i> 1/2b				
Moldes de metal						<i>L.m.</i> 1/2b		
Canastos para panela	<i>L.m.</i> 1/2a	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b					
Chiquihuite			<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b <i>L.innocua</i>	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b	
Superficies empleadas para elaboración de productos	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b			
Manos	<i>L.m.</i> 1/2b							
Refrigerador	<i>L.m.</i> 1/2b		<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b	<i>L.m.</i> 1/2b			
Pisos				<i>L.innocua</i>				
Escobeta para limpieza de canastos y superficies		<i>L.m.</i> 1/2a	<i>L.m.</i> 1/2b <i>L.innocua</i>	<i>L.m.</i> 1/2b <i>L.innocua</i>	<i>L.m.</i> 1/2b <i>L.innocua</i>	<i>L.m.</i> 1/2b		
Escoba	<i>L.m.</i> 1/2b <i>L.innocua</i>	<i>L.m.</i> 1/2b <i>L.innocua</i>	<i>L.m.</i> 1/2b		<i>L.innocua</i>			
Total de muestras positivas	7	9	12	9	4	4	4	1

† Meses transcurridos después del primer muestreo. ‡ *L.m.*: *Listeria monocytogenes* serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2 inmóvil y 4d.

Quesería B

Treinta y una (32%) de las 95 muestras recolectadas fueron positivas, 13 de los 24 puntos muestreados, fueron positivos (Cuadros 8 y 15). *Listeria innocua* fue la única especie aislada en 8 de las 13 visitas realizadas a este lugar (Cuadro 16).

Quesería C

De las 96 muestras recolectadas, 25 (26%), fueron positivas, correspondiendo a 13 de los 24 puntos de muestreo (Cuadros 9 y 17). Se aislaron las especies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii*. Comparada con las otras queserías, en esta quesería se encontró la mayor frecuencia de aislamientos de *L. welshimeri*. *Listeria monocytogenes* serotipo 4b fue aislada en 19 (76%) de las muestras positivas (Cuadro 17).

Quesería D

Solo 7 (7%) de las 96 muestras fueron positivas a *Listeria*. Los aislamientos se hicieron de muestras recolectadas en 3 de las 11 visitas realizadas y a partir de 6 de los 24 puntos de muestreo (Cuadros 9 y 18). *Listeria innocua* fue aislada en las 7 muestras y *L. welshimeri* en una sola ocasión de una muestra de la cámara de refrigeración (Cuadro 18).

Cuadro 16. Especies de *Listeria* aisladas de la quesería B según muestra y fecha de muestreo.

Muestra	Fecha							
	15-03-99 (0) [†]	10-05-99 (2)	14-06-99 (3)	17-08-99 (5)	15-02-00 (11)	18-03-00 (12)	06-05-00 (14)	12-09-00 (18)
Costal para colar leche (húmedo)					<i>L. innocua</i>			
Tela para moidear queso (húmeda)							<i>L. innocua</i>	
Recipientes para cuajar	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>				
Mezclador			<i>L. innocua</i>					<i>L. innocua</i>
Equipo para extracción de suero				<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>		<i>L. innocua</i>	
Moldes de metal						<i>L. innocua</i>		
Canastos para panela	<i>L. innocua</i>							
Chiquihuite				<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>		<i>L. innocua</i>	
Superficies empleadas para elaboración de productos		<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>				
Refrigerador	<i>L. innocua</i>			<i>L. innocua</i>				
Pisos	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>				
Escobeta para limpieza de canastos y superficies		<i>L. innocua</i>			<i>L. innocua</i>			
Escoba	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>				
Total de muestras positivas	5	5	5	7	4	1	3	1

† Meses transcurridos después del primer muestreo.

Cuadro 17. Especies y serotipos de *Listeria* aislados de la quesería C según muestra y fecha de muestreo.

Muestra	Fecha							
	03-05-99 (0) [†]	24 - 05- 99 (0.75)	26-06-99 (1.75)	20-08-99 (3)	08-12-99 (7)	18-03-00 (10)	18-09-00 (16)	9-10-00 (17)
Panela		<i>L.m.</i> 4b [‡]			<i>L. innocua</i> <i>L. welshimeri</i>		<i>L.m.</i> 4b <i>L. welshimeri</i>	
Costal para colar leche (húmedo)					<i>L.m.</i> 4b <i>L. ivanovii</i>		<i>L.m.</i> 4b	
Tela para moldear queso (húmeda)					<i>L.m.</i> 4b <i>L. innocua</i>			
Recipientes para cuajar	<i>L. sp.</i> [§]			<i>L. m.</i> ND ^Ø				
Costal para estilar cuajada								<i>L. m.</i> NT ^{††}
Molino		<i>L.m.</i> 4b						
Canastos para panela		<i>L.m.</i> 4b		<i>L.m.</i> 4b <i>L. welshimeri</i>				
Chiquihuite				<i>L.m.</i> 4b <i>L. innocua</i> <i>L. welshimeri</i>		<i>L. welshimeri</i>		
Superficies empleadas para elaboración de productos				<i>L. welshimeri</i>				
Manos		<i>L.m.</i> 4b		<i>L.m.</i> 4b				
Refrigerador	<i>L.m.</i> 4b <i>L.m. innocua</i>	<i>L.m.</i> 4b <i>L. welshimeri</i>	<i>L.m.</i> 4b <i>L. innocua</i> <i>L. welshimeri</i>	<i>L.m.</i> 4b <i>L. welshimeri</i>				
Pisos				<i>L.m.</i> 4b				
Escoba	<i>L. sp.</i>		<i>L.m.</i> 4b <i>L. welshimeri</i>	<i>L.m.</i> 4b <i>L. innocua</i> <i>L. welshimeri</i>				
Total de muestras positivas	3	5	2	8	3	1	2	1

† Meses transcurridos después del primer muestreo. ‡ *L.m.*: *Listeria monocytogenes* serotipo 4b. § *Listeria sp.* Ø *L. monocytogenes* reportada como serotipo Non designé. †† *L. monocytogenes* no enviada a tipificación.

Cuadro 18. Especies de *Listeria* aislados de la quesería D según muestra y fecha de muestreo.

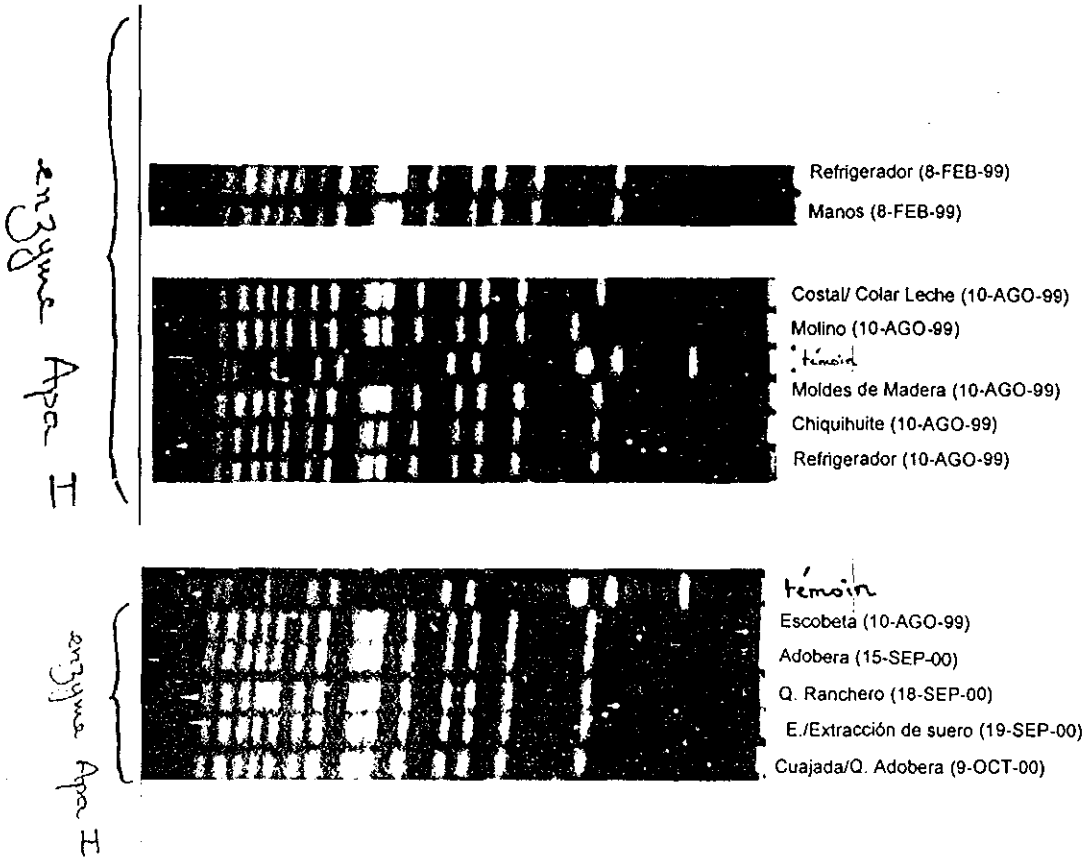
Muestra	Fecha		
	23-06-99 (2) [†]	03-08-99 (4)	25-09-00 (17)
Cuajada para Panela y Queso Ranchero		<i>L. innocua</i>	
Recipientes para cuajar		<i>L. innocua</i>	
Refrigerador	<i>L. innocua</i> <i>L. welshimeri</i>	<i>L. innocua</i>	
Manos			<i>L. innocua</i>
Piso	<i>L. innocua</i>		
Escoba		<i>L. innocua</i>	
Total de muestras positivas	2	4	1

† Meses transcurridos después del primer muestreo.

**Caracterización molecular de aislamientos de *L. monocytogenes*
procedentes de las queserías A y C**

ATENDIENDO LAS INDICACIONES DEL JURADO, LOS RESULTADOS Y
DISCUSIÓN CORRESPONDIENTES A ESTA SECCIÓN SE TRASLADARON AL
ANEXO CONSERVANDO SU PAGINACIÓN ORIGINAL.

Figura 7. Patrones de DNA genómico encontrados en aislamientos de *L. monocytogenes* serotipo 1/2b, procedentes de la quesería A. Fragmentos de DNA obtenidos con la endonucleasa de restricción ApaI y separados mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE).



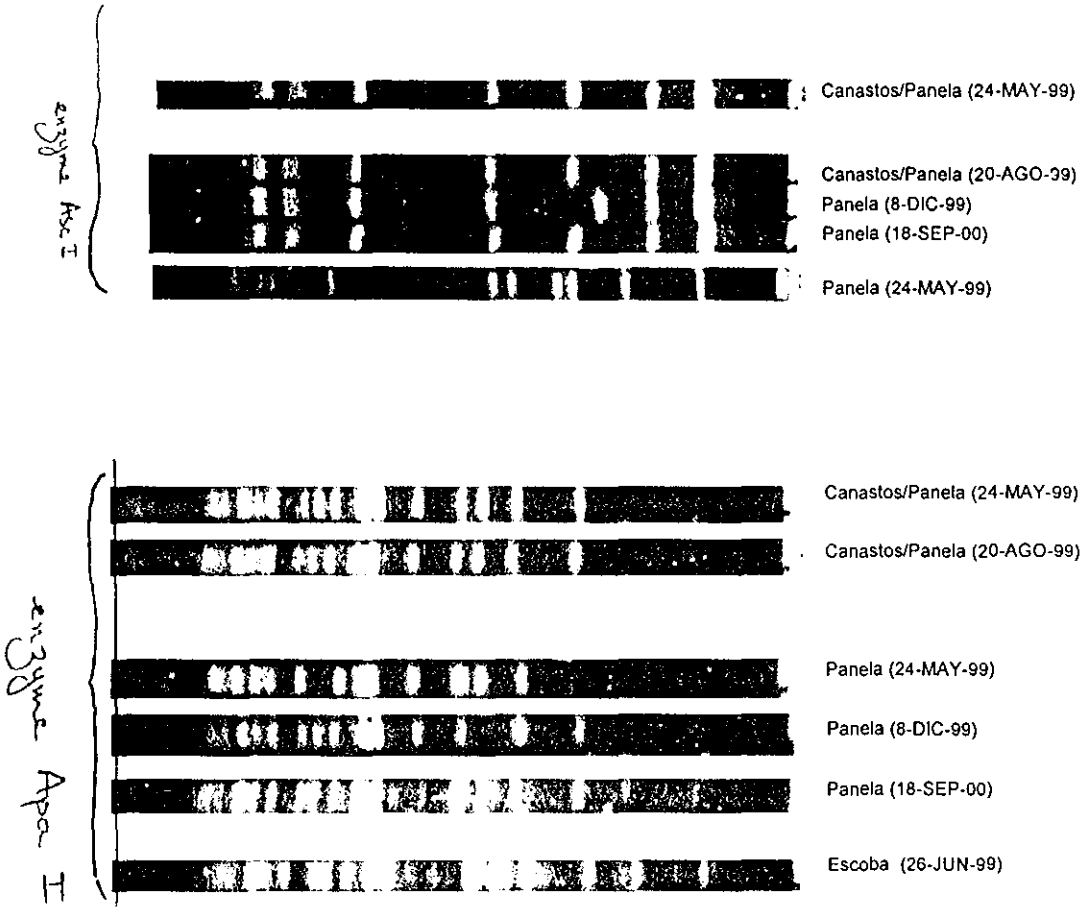
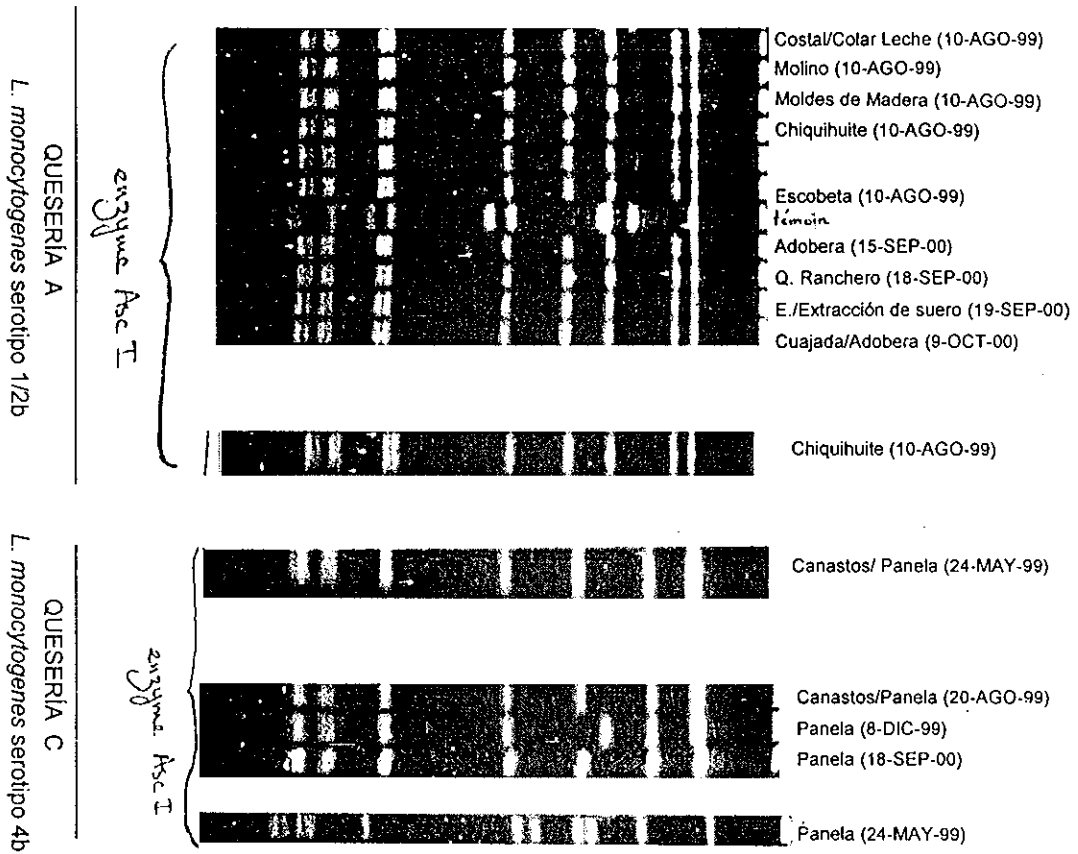


Figura 8. Patrones de DNA genómico encontrados en aislamientos de *L. monocytogenes* serotipo 4b, procedentes de la quesería C. Fragmentos de DNA obtenidos con las endonucleasas de restricción AscI y ApaI, separados mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE).

Figura 9. Comparación entre el patrón de DNA genómico en aislamientos de *L. monocytogenes* serotipo 1/2b y serotipo 4b. Fragmentos de DNA obtenidos con endonucleasa de restricción Asc I, y separados mediante electroforesis de campo pulsante (PFGE).



IV. DISCUSIÓN

Fuentes y mecanismos de contaminación

Los microorganismos están presentes en todos los lugares del planeta porque son un eslabón del ciclo seguido por la materia en la naturaleza; se encargan de desdoblar las sustancias complejas y materia orgánica muerta en sus partes integrantes mas simples para que queden nuevamente disponibles para formar a partir de ellas nuevos compuestos y nuevos organismos (Sinell, 1980; Mezcle y Zucca, 1994). De acuerdo con su capacidad de adaptación, algunos géneros y especies de microorganismos estarán presentes y predominaran en determinados sitios o medios ambientes considerándose estos el hábitat o fuente de ellos. La contaminación microbiana de los alimentos son todos aquellos procesos que tienen como consecuencia la presencia de microorganismos en la superficie o en el interior de los alimentos (Felhlhaber y Janetschke, 1992). Las fuentes de contaminación de los alimentos con microorganismos que se conocen son: el suelo, polvo, agua, aguas residuales, vegetales, hombre, animales domésticos, roedores, insectos, suciedad, utensilios, maquinas, superficies diversas, aditivos de alimentos y materiales de envasado (Felhlhaber y Janetschke, 1992, Mezcle y Zucca, 1994). Los microorganismos que pueden ser encontrados en un alimento está determinado por: la contaminación propia de las materias primas, las modificaciones fisicoquímicas que ocurren durante la elaboración del alimento (que provocarán fenómenos de selección y dominancia de ciertos géneros y especies microbianas) y la contaminación existente en los lugares donde se elaboran y almacenan los alimentos (Mezcle y Zucca, 1994). Las contaminaciones a nivel de fábrica dependen del diseño de los locales y cadenas de producción así como del nivel de higiene impuesto por las prácticas de limpieza, desinfección y mantenimiento general de la fábrica (Mezcle y Zucca, 1994).

Fuentes de contaminación con *Listeria* en fábricas de alimentos

Los brotes de listeriosis ocurridos en Massachussets y California vehiculizados por leche pasteurizada y queso blando estilo mexicano (Fleming *et al.*, 1985; Linnan *et al.*, 1988) condujeron a la búsqueda de *Listeria* en fábricas de alimentos.

Cox *et al.* (1989), investigaron las fuentes de *Listeria* en el medio ambiente de 17 fábricas de alimentos, representando 6 grupos de alimentos, incluyendo queso y otros productos lácteos. Con base a la frecuencia de aislamiento, estos autores establecieron que el drenaje, el agua estancada, el piso, los residuos y el equipo son las principales fuentes de *Listeria* en estas fábricas y que los ambientes húmedos pueden proporcionar condiciones para el desarrollo de estos microorganismos, en tanto que los ambientes secos y la restricción de residuos de alimentos contribuyen a su control (Cox *et al.*, 1989). Investigaciones posteriores (Gabis *et al.*, 1989; Klausner y Donnelly, 1991; Cotton y White, 1992; Gravani, 1999) han confirmado la importancia de los ambientes húmedos y de las fuentes arriba mencionadas.

Eilertz *et al.* (1993), consideran que las principales vías por las que *L. monocytogenes* puede llegar a contaminar los quesos son:

- a) a través de la leche cruda
- b) al estar presente *L. monocytogenes* como parte de la microbiota de la fábrica
- c) al ingresar a las fábricas a través de tierra, el aire o el agua.

Sutherland y Porrit (1995), citados por Gravani (1999), señalan que las cuatro principales vías por las que *L. monocytogenes* se introduce en las fábricas de productos lácteos son:

- a) ingredientes, principalmente leche cruda
- b) equipo empleado para transporte (canastillas, tarimas y vehículos)
- c) medio ambiente (incluyendo el aire)
- d) personas (especialmente contratistas y visitantes)

Ingredientes

Leche

Aún cuando se emplearon dos métodos de muestreo (FDA y Torunda de Moore), las muestras de leche fueron negativas en las cuatro queserías.

A nivel mundial se estima que la frecuencia de aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de leche cruda es del 3 - 3.8%, en tanto que la frecuencia de *L. innocua* oscila

entre 3.4 - 10 %, la de *L. welshimeri* es de 0.7 - 0.9% y las de otras especies son de 0.3 - 1.2 % (Ryser, 1999b).

Luis Juan Morales *et al.* (1995), recolectaron en Guadalajara, Jal., 100 muestras de leche cruda procedentes de 78 vendedores ambulantes y 22 puestos de venta al menudeo, esta investigación reportó 7% de aislamientos de *Listeria* con 5 muestras positivas a *L. innocua* y 2 muestras positivas conjuntamente a *L. innocua* y *L. welshimeri*.

Vázquez Salinas *et al.* (2001), investigaron durante un año la presencia de *Listeria* en leche cruda de cuatro establos del sureste de la Ciudad de México; recolectaron mensualmente 25 muestras de cada establo, analizando un total de 1300 muestras, el 23 % de ellas fueron positivas a *Listeria*; a nivel de especie, se aislaron *L. monocytogenes* (13%), *L. ivanovii* (6%), *L. seeligeri* (4%) y *L. innocua* (1 %).

Hassan *et al.* (2000), publicaron un estudio para determinar la prevalencia de *L. monocytogenes* en hatos lecheros del estado de Nueva York, muestrearon 404 establos colectando filtros de la línea de ordeña (1 filtro por cada establo) que habían filtrado una mediana de 1351 kg. de leche, analizándose una muestra de 25 g de cada filtro. Con este procedimiento, se aisló *L. monocytogenes* del 12.6% de las muestras, y se encontró una asociación geográfica de aislamiento de *L. monocytogenes* con las regiones central y occidental de Nueva York, lo cual podría reflejar diferencias en las prácticas de manejo de las granjas u otros factores desconocidos. Los autores señalan que los filtros, al encontrarse frecuentemente cubiertos de coágulos de leche, fibrina, alimento, materia fecal y tierra del medio ambiente de la granja, proporcionan una buena muestra compuesta de la granja, porque recoge material de varias fuentes en un solo punto.

La detección de *Listeria* en leche es complicada por diversos factores que pueden dificultar el aislamiento del microorganismo.

Vacas con listeriosis intramamaria pueden eliminar *L. monocytogenes* en forma intermitente con niveles de excreción variables que van de 10^1 a 10^5 ufc/ml (Bourry *et al.*, 1995, citados por Bourry *et al.*, 1997; Wesley, 1999) y se requiere una concentración de 10^5 a 10^7 ufc/ml para poder detectar *L. monocytogenes* en leche cruda (Shultz, 1967, citado por Hassan *et al.*, 2000) niveles que es poco probable encontrar en muestras de leche debido al factor de dilución ocasionado por la mezcla de leche de varios animales (Hassan *et al.*, 2000).

En la leche cruda existen compuestos antimicrobianos naturales, inmunoglobulinas, lisozima, lactoferrina, y el sistema lactoperoxidasa, que inhiben o destruyen a bacterias presentes en la leche (Griffiths, 2000).

Vacas no infectadas tienen en forma natural, inmunoglobulinas IgG contra antígenos de *Listeria* tanto en suero como en la leche y se ha detectado que la mastitis causada por *Listeria* induce un incremento de anticuerpos en sangre y leche contra este microorganismo (Bourry y Poutrel, 1996).

La lisozima es una enzima que hidroliza la pared celular principalmente de bacterias gram positivas que están en fase de multiplicación (Griffiths, 2000). La sensibilidad de *L. monocytogenes* a la lisozima es variable, influida por el sustrato donde se encuentre la bacteria; se ha reportado que el calcio y magnesio presentes en la leche protegen a *L. monocytogenes* contra la inactivación por lisozima (Kihm *et al.*, 1994).

La lactoferrina es una glicoproteína capaz de secuestrar el hierro, al no estar disponible este elemento, se inhibe el desarrollo de muchas bacterias (Law y Reiter, 1977, citados por Griffiths, 2000). La lactoferrina es hidrolizada por el calor, pH ácido y la pepsina, generándose lactoferricina, compuesto que inhibe a *L. monocytogenes* (Wakabayashi *et al.*, 1992, citados por Griffiths, 2000).

El sistema lactoperoxidasa (LP) tiene tres componentes (Siragusa y Johnson, 1989; Griffiths, 2000) :

- la enzima lactoperoxidasa (presente en leche, saliva y lágrimas),
- el ion tiocianato (SCN^- , presente en tejidos animales, leche y saliva) y
- peróxido de hidrógeno (H_2O_2 , producido por: lactobacilos, lactococos, oxidación de ácido ascórbico o glucosa, artificialmente puede ser añadido para activar el sistema LP).

La lactoperoxidasa cataliza la oxidación del tiocianato en presencia del H_2O_2 produciéndose hipotiocianato (OSCN^-) y otros compuestos (HO_2SCN , HO_3SCN - ácidos tiocianatoso y tiocianático-) (Siragusa y Johnson, 1989). El hipotiocianato oxida grupos sulfhidrilos de proteínas y causa daños estructurales en la membrana de las bacterias (Wolfson y Summer, 1993, citados por Griffiths, 2000). El sistema LP es inhibitorio para algunas especies bacterianas y bactericida para otras; la inhibición producida por el sistema LP es afectada por la condición metabólica de los microorganismos, el medio de desarrollo el pH y la temperatura (Griffiths, 2000).

Con relación a *L. monocytogenes* en leche se ha reportado que el sistema LP tiene efectos inhibidores (Siragusa y Johnson, 1989; Griffiths, 2000) e incluso bactericidas. El-Shenawy *et al.* (1990), citado por Lou y Yousef (1999), reportaron que poblaciones iniciales de 30 - 50 ufc/ml de *L. monocytogenes* disminuyeron a niveles no detectables después de 2 horas de exposición al sistema LP a 35 °C, usando medios de aislamiento selectivos y no selectivos, estos investigadores también demostraron que el patógeno no fue dañado subletalmente durante la exposición al sistema LP.

Ningún protocolo de aislamiento es apropiado para detectar todas las muestras que contengan *Listeria* (Slade, 1992). El desarrollo de listerias en medios de cultivo se ve influido por los agentes selectivos y por la habilidad del microorganismo para superar el reto de la microbiotacompetitiva durante el proceso de selección (Slade, 1992). La capacidad de los medios de cultivo para detectar *Listeria* esta en función de la condición en que se encuentre el microorganismo (estresada, no estresada) y los niveles de la población inicial de listerias así como del tipo y cantidad de la microbiotacompetitiva (Heisick *et al.*, 1989, citado por Slade, 1992). El protocolo de aislamiento empleado se diseñó con base a: la experiencia adquirida en investigaciones anteriores (Luis Juan Morales *et al.*, 1992a; 1992b y 1995), la disponibilidad de recursos, y el análisis de evaluaciones de medios de enriquecimiento y aislamiento de *Listeria* (Swaminathan B *et al.*, 1988; Cassidy y Brackett, 1989; Buchanan *et al.*, 1989; Lund *et al.*, 1991).

El medio de enriquecimiento utilizado fue el recomendado por la FDA en 1988 (Lovett y Hitchins, 1988) en su formulación no incluía piruvato de sodio e indicaba la adición de los inhibidores (acriflavina, cicloheximida y ácido nalidixico) al medio antes de inocularlo con la muestra. Empleando este medio se reportaron aislamientos de *Listeria* en leche cruda (Lovett *et al.*, 1987; Luis Juan Morales, 1995), e incluso se demostró que existe una variación geográfica de la frecuencia de *L. monocytogenes* en muestras de leche cruda (Lovett *et al.*, 1987). En 1995, la FDA modificó su medio de enriquecimiento para favorecer la recuperación de células de *Listeria* con daño subletal, para ello incluyó piruvato de sodio en la fórmula del medio e indicó la adición de los inhibidores después de haber incubado por 4 h el medio inoculado con la muestra de alimento (Hitchins, 1995).

La prueba de inhibidores empleada (BSDA), es el método oficial de EUA para la detección cualitativa de sustancias inhibitoras en leche, esta prueba permite detectar la presencia de algunos inhibidores naturales de la leche que corresponden a los

inhibidores termolábiles los cuales son evidenciados al ser inactivados por calor cuando se realiza la prueba confirmatoria (Cullor, 1992; Maturin, 1995).

Es posible que el reducido número de muestras investigadas -16-, junto con la baja frecuencia *Listeria* en leche influyeran para que no se obtuvieran aislamientos en este tipo de muestra.

La detección de una muestra de leche positiva a inhibidores termolábiles sugiere que la situación extrema que pudo haber ocurrido fue que los inhibidores naturales presentes en la leche se pudieron encontrar activos y en concentraciones suficientes para causar daño subletal a listerias que estuvieran presentes en la muestra y que al ser inoculadas en un medio de enriquecimiento no apto para células dañadas se obtuvieran resultados negativos.

En el procedimiento de la Torunda de Moore, la no detección de *Listeria* pudo deberse a que no se guardaron la proporción 1: 10 (muestra: medio de enriquecimiento) lo que pudo limitar los nutrientes disponibles.

Con base a los trabajos de Lovett *et al.* (1987) y de Hassan *et al.* (2000) que reportan variaciones geográficas no puede descartarse la posibilidad de que la leche que reciben las queserías artesanales provenga de una región en donde efectivamente no es frecuente *L. monocytogenes*.

Se ha confirmado la difusión de cepas idénticas de *L. monocytogenes* del ambiente de la granja hacia el suministro de leche cruda y finalmente a las plantas de lácteos (Harvey y Gilmour, 1992, citados por Ryser, 1999).

Durante la investigación de un brote de listeriosis (Boggs *et al.*, 2001) asociado al consumo de queso fresco estilo mexicano, se aisló *L. monocytogenes* a partir de pacientes, queso y leche cruda procedente de una de las granjas proveedoras. En la tipificación molecular, todos los aislamientos fueron indistinguibles unos de otros, demostrando de esta forma una relación entre la enfermedad en humanos, el queso y la leche cruda, sin embargo, las muestras colectadas de todas las vacas de la granja implicada, fueron negativas, sugiriendo que las vacas no estaban infectadas y que *L. monocytogenes* pudo haberse originado a partir de la contaminación medio ambiental.

Dijkstra (1987, citado por Schönberg y Gerik, 1991) reporta que la leche del 16% de vacas que abortaron por listeriosis estuvo contaminada con *Listeria* durante 1-12 meses, la ubre de estos animales tenía una inflamación ligera por lo que no había cambios visibles en la leche. La listeriosis intramamaria es rara pero persistente, no es

frecuente la cura espontánea y en la mayoría de los casos los tratamientos con antibióticos son ineficientes por lo que, los animales infectados deben ser eliminados del hato (Fedio, 1990, citado por Boury *et al.*, 1997).

Listeria ha sido aislada a partir del 10 -15 % de muestras de excremento de bovinos y, vacas que han abortado, han eliminado *L. monocytogenes* por las heces durante 3-12 meses (Schönberg y Gerik, 1991).

En las 4 queserías estudiadas, los lecheros entraban hasta el área de elaboración para vaciar la leche en los recipientes para cuajar; el ingreso de lecheros y enjuagado de cántaras empleando equipo y enseres de limpieza dentro del área de elaboración (Cuadro 14) constituyen vías por las que pudieran ingresar a la quesería listerias presentes en el medio ambiente de los establos. La quesería B recibía leche de un solo proveedor, las queserías A y C de 2 proveedores, en tanto que la quesería D recibía leche de 10 proveedores. Bajo estas condiciones, se esperaba que en la quesería D se aislara *Listeria* con mayor frecuencia y que hubiera una mayor variedad de especies presentes, no sucedió así; la quesería D presentó el menor número de aislamientos de *Listeria* y la mayor frecuencia de muestreos negativos, pues solo en 3 de las 11 visitas realizadas pudieron aislarse *L. innocua* y en una ocasión, *L. welshimeri*. Estos resultados sugieren que, comparada con otras posibles fuentes, la leche cruda y el medio ambiente de los establos no constituyeron una fuente importante de *Listeria* para las queserías investigadas.

En una fábrica de helados de crema se aisló *Listeria* a partir de los drenajes, transportadores, agua estancada, pisos, residuos y productos descartados; esta fábrica elaboraba todos sus productos con leche en polvo reconstituida (producto del cual no se han reportado aislamientos de *Listeria*) lo que sugiere que la contaminación por *Listeria* en plantas de lácteos no siempre está ligada a la leche cruda que llega o al lechero que la lleva (Cox, 1988, citado por Gravani, 1999).

Cuajo

Las marcas utilizadas contenían 1.9% de propionato de sodio y 0.1% (1000 ppm) de benzoato de sodio como conservadores.

El-Shenawy y Marth (1989), demostraron que el propionato de sodio a concentraciones de 0.25%, en caldo soya a pH 5, no permitió el desarrollo de *L. monocytogenes* y a 0.3%, lo inactivó después de 80 h. El benzoato de sodio también es inhibitorio para *L. monocytogenes*. (Low y Yousef, 1999)

Ninguna de las muestras de cuajo analizadas fue positiva por lo que suponemos que pudo deberse a que los conservadores presentes inhibieron o destruyeron listerias que podrían haber estado presentes.

Piso y Enseres de limpieza

En las 4 queserías estudiadas, las muestras del piso y la escoba fueron positivas al menos en una ocasión y de los 24 puntos muestreados, la escoba tuvo la mayor frecuencia de muestras positivas (Cuadros 9, 15, 16, 17 y 18).

Las bacterias del género *Listeria* están ampliamente distribuidas en la naturaleza: han sido aisladas del suelo, vegetación, agua, aguas negras, alimento para animales, personas y animales portadores (Seeliger y Jones, 1986). Las distintas especies del género comparten los mismos nichos en el medio ambiente (King, *et al.*, 1990, citados por Slade, 1992). *Listeria monocytogenes* puede sobrevivir en el suelo de 67 a >730 días (Fenlon, 1999). La presencia de *L. monocytogenes* en el suelo probablemente es consecuencia de la contaminación de este con vegetación en descomposición y materia fecal; la superficie húmeda del suelo proporciona un medio ambiente protector húmedo y frío y la vegetación en descomposición proporciona nutrientes así, el binomio suelo-vegetación permite la sobrevivencia de *L. monocytogenes* de una a otra estación (Fenlon, 1999).

Pritchard *et al.* (1994), reportan que la proximidad a granjas es un factor que incrementa la presencia de *Listeria* en lugares donde se elaboran productos lácteos.

Gravani (1999) al analizar los resultados de investigaciones realizadas en diversas plantas de alimentos ubicadas en diferentes lugares concluye que el hecho de haber aislado con mayor frecuencia *Listeria* a partir del drenaje y el piso sugiere que estas áreas funcionan como reservorios de listerias en las plantas de alimentos.

En nuestro estudio, las muestras de piso incluyeron el área de coladeras de drenaje y si tomamos en cuenta que la escoba funciona recolectando y diseminando contaminantes presentes en el piso, con base a los resultados obtenidos en estos puntos, consideramos que también en las queserías artesanales, el piso y el drenaje son reservorios de *Listeria*.

En el pueblo, la mayoría de las calles estaban empedradas y las queserías estaban ubicadas cerca de áreas sin construir. Al existir en el área de elaboración coladeras de drenaje abiertas, ingreso de lecheros, derrames de leche en el piso, en ocasiones, presencia de animales cerca de esta área o introducción de polvo del exterior (Cuadro 14) consideramos que estas pudieran ser las fuentes iniciales de contaminación del piso y de reintroducción de *Listeria* en las queserías.

Las escobetas y cepillos de plástico empleados en la limpieza de canastos para la panela y los chiquihuites eventualmente caen al piso y sin una adecuada higienización, siguen usándose. Estos enseres de limpieza además del cepillado de canastos son empleados para cepillar las superficies de elaboración y los refrigeradores por lo que pueden intervenir activamente en contaminaciones entre piso, refrigerador, equipo y superficies.

Equipo

La presencia de *Listeria* en equipo de queserías ha sido reportada en Europa. Cox *et al.* (1989), encontró un 12% de muestras positivas en equipo de procesamiento de 5 plantas que producían especialidades de queso estilo italiano. Terplan (1988, citado por Gravani, 1999), reporta un 17% de muestras positivas a *Listeria* en maquinaria empleada en plantas productoras de queso blando untable. Durante la investigación para localizar la fuente de contaminación en el brote de listeriosis asociado al consumo de queso Vacherin Mont d'Or, las autoridades suizas aislaron la cepa epidémica de *L. monocytogenes* a partir de varias muestras, incluyendo moldes, tablas y anaqueles de madera usados en 10 diferentes queserías que elaboraron el queso contaminado (Breer C, 1988, citado por Gravani, 1999).

Cincuenta y una (42%) de las 120 muestras de equipo analizadas en nuestro trabajo fueron positivas a *Listeria* y esta categoría tuvo el mayor porcentaje de muestras positivas (Fig. 6) comparadas con los estudios arriba mencionados, es evidente que en las queserías artesanales, el equipo interviene de forma importante en la contaminación de los quesos durante su elaboración.

Recipientes para cuajar

Los recipientes para cuajar fue otro punto de muestreo que fue positivo en las cuatro queserías (Cuadros 9, 15, 16, 17 y 18). Estos recipientes son de plástico y en ellos se recibía y cuajaba leche aproximadamente cada 12 horas (Cuadro 13), durante la elaboración de los quesos, la leche-cuajada permanecía en ellos 2-3 horas (Fig. 3). Cuando los recipientes para cuajar son lavados, quedan residuos de agua en su interior y al acomodarlos al final de la jornada, en algunos casos el borde interno entra en contacto con el piso o bien, como existe el hábito de colocar un recipiente sobre otro, la base externa (en contacto con el piso) de un recipiente entra en contacto con la parte interna de otro (Cuadro 14).

Listeria monocytogenes sobrevive 1,2 y 6 días en agua destilada almacenada a 22, 30 y 40 °C respectivamente (Dickgiesser, 1980, citado por Lou y Yousef, 1999) y puede adherirse a acero inoxidable, vidrio, polipropileno y caucho después de 20 a 60 minutos de contacto (Mafu *et al.*, 1990, citados por Lou y Yousef, 1999). La leche y las proteínas de la leche (caseínas, alfa-lactoalbumina y beta-lactoglobulina) reducen la fijación de *L. monocytogenes* a acero inoxidable (Wong, 1998).

En la quesería B, se observó que algunas veces, los recipientes quedaban con residuos de cuajada de la jornada vespertina y solo fueron enjuagados por la mañana para recibir la leche y cuajar nuevamente. En esta quesería todas las muestras de recipientes fueron positivas (Cuadros 9 y 16).

Consideramos que el contacto directo o indirecto que ocurre entre el piso y el interior de los recipientes para cuajar, la humedad, los residuos de cuajada y el retraso en el lavado crean condiciones favorables para la sobrevivencia y quizás para el desarrollo de *Listeria* en este equipo constituyéndolo un punto inicial de contaminación de la leche y la cuajada.

Costal para colar leche y tela para moldear queso

La transferencia de la leche de las cántaras a los recipientes para cuajar ocurre a través de un costal de tela que sirve para retener (colar) impurezas macroscópicas (pelo, alimento, polvo) que suele traer la leche cruda. Al inicio de la jornada matutina, este costal podía encontrarse: (a) seco por haberse lavado el día anterior al final de la jornada matutina, (b) húmedo por haberse lavado la tarde-noche anterior o (c) "recién lavado" lo que implicaba que había permanecido durante la noche con impurezas de la leche y sobre equipo, recipientes o superficies empleadas en la elaboración de quesos y que había sido lavado poco antes de empezar a colar la leche matutina; en la investigación, se incluyeron como costales húmedos los que se encontraban en las situaciones (b) o (c).

La tela empleada para moldear el queso adobera es humedecida antes de su empleo, para evitar que se adhiera al queso.

Es interesante observar que solo de costales y telas húmedas se aisló *Listeria* (Cuadros 15, 16 y 17). Cox *et al.* (1989), investigaron la presencia de *Listeria* en 35 casas; el trapo de la cocina fue el sitio con mayor frecuencia de aislamiento de *Listeria* (17%) incluyendo *L. monocytogenes* (11%). Los resultados obtenidos en las muestras de costal y tela para moldear, son congruentes con lo señalado por Cox *et al.* (1989), con relación a la preferencia de *Listeria* por ambientes húmedos y su control en ambientes secos, aunque los resultados también sugieren la posibilidad de que las telas pudieran contaminarse cuando son humedecidas o lavadas.

Equipo para extracción de suero

En su primera etapa, la extracción de suero (Fig. 3) se lleva a cabo introduciendo un recipiente pequeño (jícara o balde o bote) dentro de los recipientes con cuajada. Cuando el nivel del suero está próximo a la cuajada se introduce una coladera de metal o un chiquihuite para evitar que, junto con el suero extraído, se mezclen porciones de cuajada. Pudo observarse que este equipo entra en contacto con el piso (Cuadro 14) y con superficies empleadas en la elaboración de los quesos antes y durante la extracción de suero así como presencia de residuos; estas situaciones permiten que ocurran contaminaciones entre el piso, superficies y cuajadas.

Chiquihuite

El chiquihuite fue el equipo del que con mayor frecuencia se aisló *Listeria* (Cuadro 9). Por sus dimensiones y características de entramado, el chiquihuite es un equipo multifuncional en las queserías artesanales; durante la extracción del suero es una barrera eficaz entre este y la cuajada, sirve de depósito de la cuajada durante la chedarización del queso adobera y finalmente, es un recipiente adecuado para colocar el requesón caliente y posteriormente almacenarlo en refrigeración. Esta multifuncionalidad lo constituye en el equipo con mayor desplazamiento en distintos puntos de la quesería (incluyendo el piso) y por tanto con mayor posibilidad de participar en contaminaciones cruzadas.

Canastos para Panela

La cuajada adquiere la forma característica de la panela al colocarse en los canastos de carrizo u otate, este equipo igual que el chiquihuite, entra en contacto con las superficies de elaboración, el refrigerador y ocasionalmente con el piso, por lo que además de ser una fuente de contaminación con *Listeria* de la parte superficial de la panela, también participará en contaminaciones de la cuajada (los canastos se llenan introduciéndolos al recipiente con cuajada), las mesas donde se lleva a cabo el escurrimiento del suero y las parrillas y anaqueles del refrigerador.

En las 4 queserías, las panelas eran trasladadas con todo y canasto en cajas de plástico hasta el punto de venta ubicado en la zona metropolitana de Guadalajara. Al menos las panelas de la quesería A, son vendidas en tianguis y aproximadamente 10 h después de haber sido sacados del refrigerador, (Cuadro 13) los canastos vacíos y el producto no vendido retornan a la quesería. En las queserías A, B y C, los canastos se sumergen en el suero frío remanente de la elaboración del requesón hasta que son cepillados antes de volverse a utilizar. Bajo estas circunstancias (humedad y aporte de nutrientes del suero y/o de los residuos de panela) se generan condiciones que favorecen la sobrevivencia de *Listeria* en los canastos. Es posible que durante el tiempo que los canastos permanecen sumergidos en el suero, algunas listerias se difundan en este líquido contaminándolo. Después de que se extraen los canastos, el suero se tiraba al drenaje, para llegar a las coladeras, el suero corría por una parte del piso del área de elaboración representando así una fuente de contaminación, humedad y nutrientes.

Moldes de madera, metal y Molino

Las frecuencias encontradas en estos puntos parecen estar en relación con la contaminación general de la quesería y de las cuajadas (Cuadro 9 y 15) es factible que en estos puntos se dé una intercontaminación entre la cuajada y estos equipos; la humedad y nutrientes de la cuajada favorecerán la formación de biopelículas de *Listeria* en los moldes y el molino, al pasar por estos equipos, las cuajadas de queso rancho y adobera se contaminan o aumentan su contaminación.

Superficies

Superficies empleadas para elaboración de productos

Las mesas de madera, acero inoxidable y meseas de azulejo son empleadas para el escurrimiento del suero de las cuajadas y el moldeo de los quesos rancho y adobera; fue raro que ocurriera un contacto directo entre las cuajadas y estas superficies. Es posible que la contaminación observada en este punto este relacionada con la contaminación existente en el suero y en los equipos que se colocan en ellas. El escurrimiento de suero puede aportar nutrientes y humedad para que ocurra la formación de biopelículas en este punto.

Manos

Kerr *et al.* (1993), reportó una frecuencia del 12% de *Listeria* en las manos de personas que trabajaban en la industria de alimentos. En nuestro trabajo, la frecuencia fue del 25 % (Cuadro 9), los procedimientos seguidos para la recolección y análisis de muestras en ambos estudios fueron distintos, lo que en parte podría explicar estas diferencias, sin embargo se confirma que las manos participan en la contaminación de los quesos durante su elaboración artesanal. La frecuencia de *Listeria* a partir de las manos posiblemente refleje las prácticas individuales que tiene el personal y la contaminación existente en cada quesería (Cuadros 14 a 18).

Después de adicionar el cuajo y hasta que la cuajada llega a la consistencia adecuada para su primer y segundo corte, el personal se dedica a realizar diversas actividades:

- enjuagar y/o lavar pisos, superficies, telas, costales, cajas de plástico
- cepillar canastos
- acondicionar la cuajada del queso adobera y/o elaborar y refrigerar el queso adobera
- vaciar de los cazos el suero remanente de la elaboración nocturna de requesón
- comer
- salir de la quesería a realizar compras diversas.

En esta serie de actividades las manos entran en contacto con el piso, superficies, equipo y productos contaminados con *Listeria* y al cortar manualmente y manipular la cuajada, la contaminan. Cuando un recipiente contenía solo la cuarta parte de su capacidad, fue usual que transfirieran su contenido (leche o cuajada) de un recipiente a otro, en esta maniobra, las manos del personal entraban en contacto con el piso pudiendo generar a través de esta maniobra una contaminación cruzada entre el piso, la cuajada y el interior de los recipientes para cuajar.

Durante la elaboración de la panela (Fig. 3) en la etapa del segundo llenado de canastos las manos entran en contacto con la parte que corresponderá al centro de la panela por lo que las manos pueden participar en la contaminación de la parte interna de la panela.

Refrigerador

La presencia de *Listeria* en refrigeradores y áreas de refrigeración de productos lácteos ha sido reportada por varios autores. Klausner y Donnelly (1991) encontraron un 27 % de frecuencia de *Listeria* en piso del área de enfriadores en plantas de lácteos en Vermont, EUA; en fábricas de helados, Cotton y White (1992) reportan un 14.3 % en el medio ambiente del refrigerador y Pritchard *et al.* (1994), aislaron *Listeria* en el 11.5% de las muestras colectadas en el área de refrigeradores y congeladores de diversas plantas de productos lácteos. Eilertz *et al.* (1993), señalaron que el queso podía contaminar los anaqueles del refrigerador convirtiendolo en un reservorio de *Listeria* para los nuevos quesos que allí se depositaran.

La frecuencia de aislamiento de *Listeria* a partir de los refrigeradores (69 %) (Cuadro 9), sugiere que la refrigeración de los quesos constituye la etapa en la que estos productos tienen mayores posibilidades de contaminarse superficialmente.

Jacquet *et al.* (1993), aislaron *L. monocytogenes* de los anaqueles empleados para la maduración de quesos. Terplan (1988, citado por Gravani, 1999), encontró *Listeria* en maquinaria empleada en la elaboración de queso blando unttable. Del análisis de estos trabajos, Gravani (1999) concluye que en las últimas etapas de elaboración y almacenamiento de los quesos con maduración superficial por hongos y bacterias, existen oportunidades para la contaminación con *Listeria*; consideramos que esta afirmación también es válida para los quesos blandos elaborados artesanalmente.

Mínimo en una ocasión los aislamientos del refrigerador y de la escoba correspondieron a la misma especie de *Listeria* (Cuadros 15 a 18) y, en las queserías A, B y C al menos en un mismo muestreo las especies de *Listeria* encontradas en el piso fueron las mismas que se aislaron de la escoba (Cuadros 15 a 17). Estos datos sugieren que *Listeria* presente en el piso se disemina al refrigerador a través los enseres de limpieza al ser empleados para la limpieza tanto del área de elaboración como de los refrigeradores (Cuadro 14). En la quesería A, en una ocasión fue posible observar que cuando limpiaban los refrigeradores, ponían a secar las parrillas sobre el pasto de un pequeño jardín próximo al refrigerador (Cuadro 14); el contacto de las parrillas con el hábitat natural de *Listeria*, tierra y vegetación en descomposición, (Rocourt y Seeliger, 1985, citados por Fenlon, 1999) constituye otra vía de contaminación de las superficies del refrigerador.

Listeria monocytogenes al igual que otras bacterias que habitan la capas superficiales del suelo, ha desarrollado formas de adaptación a los cambios ambientales frecuentes (Juneja *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1999) en especial a los relacionados con la temperatura (Bayles *et al.*, 1996; Annous *et al.*, 1997; Juneja *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2002), disponibilidad de nutrientes (Lou y Yousef, 1997; Herbert y Foster, 2001), presión osmótica (Beumer *et al.*, 1994; Verheul *et al.*, 1997), acidez (O'Driscoll *et al.*, 1996) y altas concentraciones de NaCl (Isom *et al.*, 1995).

Listeria desarrolla en un rango de temperatura de 2 - 45 °C (Seeliger y Jones, 1985). La capacidad de *L. monocytogenes* para desarrollar a temperaturas de refrigeración fue una característica descrita por primera vez en 1948 (Gray *et al.*, citados por Zheng y Kathariou, 1995), identificándose que la refrigeración actúa como un factor que permite la multiplicación selectiva - (enriquecimiento) de este microorganismo con relación a otros.

En las bacterias, las estrategias conocidas para la adaptación a bajas temperaturas son: cambios en la composición de lípidos de la membrana (Klein *et al.*, 1999) y la acumulación de compuestos orgánicos estabilizantes, tales como, azúcares, polioles, aminoácidos y aminos cuaternarias (Rowbury, 1995; citado por Klein *et al.*, 1999). Se ha reportado que *L. monocytogenes* tiene capacidad para adaptarse a bajas temperaturas tanto por modificación de lípidos de la membrana (Annous *et al.*, 1997) como por acumulación de crioprotectores (Ko *et al.*, 1994).

La betaina y la carnitina son aminoácidos que pueden actuar como osmoprotectores y crioprotectores para *L. monocytogenes* (Beumer *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 2000). El factor σ^B es una subunidad de la RNA polimerasa (Becker *et al.*, 1998) que contribuye a la adaptación de *L. monocytogenes* a bajas temperaturas modulando la acumulación y utilización de betaína y carnitina como crioprotectores (Becker *et al.*, 2000). La actividad de este factor se detecta dentro de los 20 minutos posteriores a la detección de señales de stress por la membrana bacteriana (Becker *et al.*, 2000).

La leche de vaca contiene 120 a 140 nmol/ml de carnitina (Campoy *et al.*, 1997). *Listeria monocytogenes* ha desarrollado en suero de leche conteniendo carnitina (Angelidis *et al.*, 2002).

Después de la escoba, el refrigerador fue el punto de muestreo con mayor frecuencia de aislamiento de *Listeria* siendo positivo en 2 a 4 ocasiones en cada quesería (Cuadros 9, 15, 16, 17, y 18). La panela es elaborada tanto en la jornada matutina como en la vespertina (Cuadro 13), durante la refrigeración de este queso, se libera suero que impregna los anaqueles y parrillas y se acumula en la parte inferior de los refrigeradores o en el piso de las cámaras de refrigeración. La presencia de suero y residuos de queso en los refrigeradores (Cuadro 13) puede asegurar el suministro constante de carnitina y nutrientes favoreciendo el desarrollo de listerias que sean introducidas a los refrigeradores, constituyéndose así este sitio, junto con el piso del área de proceso en las principales fuentes de contaminación con *Listeria* dentro de las queserías.

Modelo de contaminación de los quesos durante su elaboración artesanal

Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, proponemos el siguiente diagrama (Figura 7) para explicar las fuentes y mecanismos de contaminación con *Listeria* durante la elaboración artesanal de quesos frescos en las queserías estudiadas.

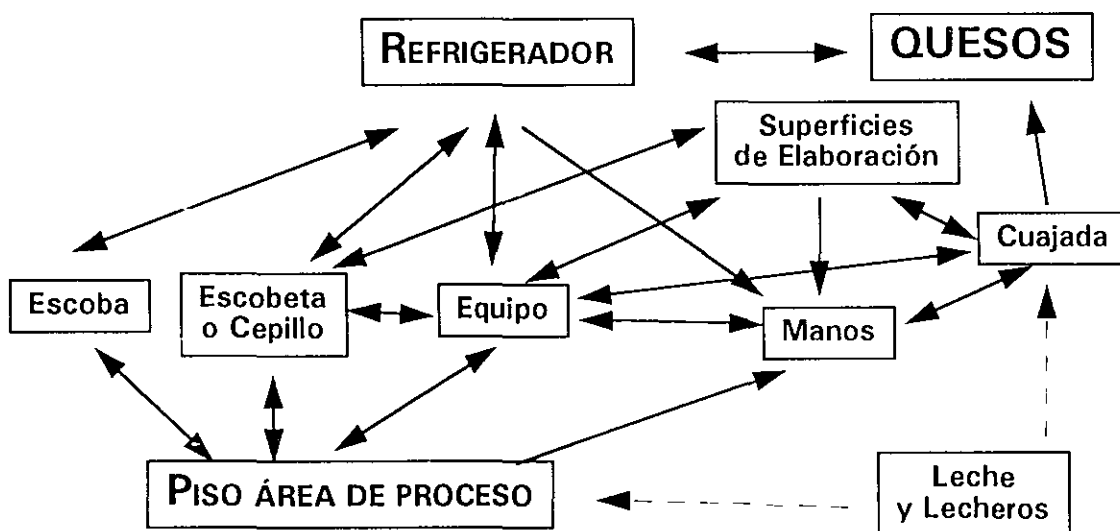


Figura 10. Diseminación de *Listeria* en queserías artesanales.

Las fuentes y mecanismos de contaminación propuestos aquí, pueden estar presentes en otras queserías del pueblo donde se realizó este trabajo y en aquellos lugares donde tengan infraestructura y procedimientos similares de elaboración.

Se han identificado en dos poblaciones de Jalisco, formas artesanales para elaborar Panela que difieren de la que se describió en este trabajo, la contaminación con *Listeria* de estas otras variantes de Panela, serán motivo de futuras investigaciones.

Persistencia de especies y serotipos de *Listeria*

Por la importancia que tiene *L. monocytogenes* en la salud humana, la mayoría de las investigaciones y metodologías de aislamiento se han enfocado hacia esta especie habiéndose dejado de lado el estudio de las otras especies del género. (Slade, 1992).

Ryser *et al.* (1996) y Loncarevic *et al.* (1996), sugieren que los medios de enriquecimiento pueden suprimir o favorecer el aislamiento de ciertos ribotipos[†] de *Listeria* o algunas clonas[‡] de *L. monocytogenes*. Aún cuando esto haya ocurrido, es evidente que en cada quesería predominó una determinada especie de *Listeria*, y además, en las queserías A y C un serotipo específico de *L. monocytogenes* (Cuadros 15 a 18).

El desarrollo de *Listeria* a temperaturas de refrigeración puede variar entre cepas y es influido por el tipo de sustrato empleado. Doyle (1988), menciona un trabajo realizado por Donnelly y Briggs (1986), en el cual, cepas de *L. monocytogenes* del serotipo 4b desarrollaron a temperaturas de refrigeración en tanto que cepas de los serotipos 1 y 3 no lo hicieron, observándose que el desarrollo de las cepas a temperaturas de refrigeración fue aumentado cuando se empleó leche entera en lugar de leche descremada, señalando que el efecto estimulador de la leche completa fue más dramático a los 10°C donde las células se incrementaron de 7.9×10^0 a 5.8×10^6 ufc/ml en 48 horas.

Las queserías C y D contaban con anaqueles de madera en sus áreas de refrigeración. La madera está compuesta de lignocelulosa y polímeros de xilano, estos polímeros pueden ser rotos por xilanasas de microorganismos comunes en el suelo (Woong, *et al.*, 1988, citado por Cox, *et al.*, 1989). La xilosa obtenida por acción enzimática podría representar la fuente de carbono principal en ambientes con madera y por tanto seleccionar organismos con enzimas para su asimilación (Cox *et al.*, 1989). *Listeria ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri* son fermentadoras de xilosa (Hitchins,

† Cepas bacterianas con determinado patrón de rRNA (Ryser *et al.*, 1996).

‡ Cepas que pueden ser aisladas de diferentes sitios y en diferentes tiempos pero que comparten muchas características fenotípicas y genotípicas y por tanto es probable que tengan un origen común (Ørskov y Ørskov, 1983, citados por Zheng y Kathariou, 1995).

1995). En la quesería C, *L. welshimeri* fue aislada en 7 de las visitas realizadas, con una distancia de 15 meses entre el primer y último aislamiento de *L. welshimeri*, encontrándose esta especie en muestras del refrigerador, escoba, panela, canastos para panela y chiquihuite (Cuadro 17); producto y equipo que durante los muestreos se encontró en estrecho contacto con los entrepaños de madera.

La capacidad de algunas cepas de *Listeria* para desarrollar en el medio ambiente del refrigerador y de la propia quesería, puede conferirle una ventaja competitiva que le permite permanecer por largos períodos en las queserías. Lo anterior podría explicar la presencia de *L. innocua* en las 4 queserías, una sola especie en la quesería B, el predominio de *L. monocytogenes* en la quesería A y la variedad de especies en la quesería C (Cuadros 15 a 18).

El aislamiento de una sola especie de *Listeria* en fábricas de alimentos ha sido reportada en otros lugares. Venables (1989, citado por Slade, 1992) reportó que en una planta de productos lácteos en Australia, la única especie aislada fue *L. seeligeri*. Cuando se investigó en California la presencia de *Listeria* en 39 plantas de productos lácteos congelados, se encontró que *L. monocytogenes* (12.8%) fue la única especie aislada en 5 plantas y *L. innocua* fue la única especie recuperada en 13 plantas (33.3%), ambas especies fueron aisladas a partir de 9 (23.1%) plantas; los autores señalan que al parecer, con frecuencia, una sola especie de *Listeria* puede predominar en ciertos sitios de la fábrica y sugieren que se requiere investigar la competición de especies de *Listeria* por nichos medioambientales en las fábricas de alimentos (Walker *et al.*, 1991, citados por Slade, 1992 y Gravani, 1999).

Los resultados de nuestro trabajo muestran que al igual que en la producción industrial, en la producción artesanal también ocurre aislamiento de una sola especie de *Listeria*. En este aspecto se requiere investigar los factores que determinan que especies no patógenas de *Listeria* predominen en las queserías, pues esto permitiría desarrollar una estrategia de exclusión competitiva a nivel de plantas de alimentos que disminuiría los riesgos de contaminación con *L. monocytogenes* en estos lugares.

Patrones de DNA en aislamientos de *Listeria monocytogenes*

ATENDIENDO LAS INDICACIONES DEL JURADO EL CONTENIDO DE ESTA SECCIÓN
SE TRASLADÓ AL ANEXO, CONSERVANDO SU PAGINACIÓN ORIGINAL.

Listeria innocua

Listeria innocua es la especie genéticamente mas cercana a *L. monocytogenes* y, aunque comparte sus mismos nichos ecológicos, no es patógena ni para humanos ni para animales (Lan *et al.*, 2000). *Listeria innocua* al igual que *L. monocytogenes* tiene la proteína p60 que es requerida para la adhesión e internalización de *L.monocytogenes* (Bubert *et al.*, 1994; Kuhn y Goebel, 1989, citados por Rowan *et al.*, 2000). *Listeria innocua* también cruza la barrera intestinal y llega al hígado (Pron *et al.*, 1998).

Las consecuencias de una infección por *Listeria* depende de tres variables principales: (a) el número de bacterias ingeridas en el alimento, (b) la patogenicidad de la cepa ingerida y (c) el estado inmunológico del individuo (Vázquez Boland *et al.*, 2001). Es común encontrar en personas sanas linfocitos T contra antígenos de *Listeria* (Munk y Kaufmann, 1988, citados por Vázquez Boland *et al.*, 2001) esto probablemente es debido a una estimulación crónica del sistema inmune por la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos (Vázquez Boland *et al.*, 2001).

Gegingnat *et al.* (1999, citados por Vázquez Boland *et al.*, 2001), demostraron que *L. innocua* puede estimular a linfocitos T de memoria específicos contra *L. monocytogenes* a través del reconocimiento de los epitopes para la proteína p60 que están presentes en ambas especies.

Siendo común la presencia de *L. innocua* en los alimentos posiblemente el contacto con *L. innocua* pueda reforzar la inmunidad contra *L. monocytogenes* y explique en parte por que en general, es rara la ocurrencia de listeriosis en la población (Vázquez Boland *et al.*, 2001).

Gravani (1999) al analizar los resultados de Cox *et al.* (1989), identifica que en plantas de alimentos, *L. monocytogenes* fue rara en el piso y que, *L. innocua* fue frecuente en el piso, agua estancada, residuos y equipo, lo cual sugiere que *L. innocua* se mueve del drenaje hacia el piso y los residuos; una vez presente en el medio ambiente de las áreas de trabajo, *L. innocua* es diseminada por los empleados al equipo de procesamiento que está en contacto directo con el producto (Gravani 1999). Lo anterior pudo haber ocurrido en las queserías estudiadas pues en todas ellas se encontraron rejillas de drenaje abiertas (Cuadro 14) y *L. innocua* fue aislada del piso y/o escoba de las 4 queserías (Cuadros 15 a 18), lo que apoya la suposición de que el piso es una de las fuentes de contaminación en estos lugares.

El hecho de que *L. innocua* y *L. monocytogenes* ocupen nichos ambientales similares indica que la detección de *L. innocua* y otras especies de *Listeria* en el área de elaboración, debe conducir a acciones correctivas para reducir su frecuencia en esta área (Gravani, 1999).

Possible punto critico de control

La distribución tan amplia que tiene en la naturaleza el género *Listeria* (Seeliger y Jones, 1986) y las características propias de la producción y transformación de la leche hacen que sea difícil la eliminación de *Listeria* de plantas de productos lácteos.

Venables (1989, citado por Gravani, 1999) menciona que aun con estrictos programas de limpieza y desinfección implementadas en varias plantas de lácteos de Melbourne, Australia, fue muy difícil eliminar *Listeria* del área de procesamiento y que en una de las plantas continuamente se aislaron listerias durante un período de 5 meses.

Gravani (1999) señala que aunque es casi imposible la eliminación de listerias de las fábricas de productos lácteos, siguiendo prácticas de manufactura que incluyan programas rigurosos de limpieza y desinfección, se reduce la probabilidad de producir productos contaminados con *Listeria*.

El incremento de la incidencia total de *Listeria* conforme transcurre el tiempo después de una limpieza a fondo fue demostrado en una investigación realizada en un cuarto de empaquetado de productos cárnicos. El cuarto fue limpiado durante 3 días y se desinfectó con vapor conteniendo 200 ppm de amonio cuaternario, después de este tratamiento detectaron listerias en 1 de 19 muestras (5%) del medio ambiente del cuarto. Posteriormente se empaquetaron productos cárnicos durante 2 semanas. A pesar

de sujetarse diario a los procedimientos normales de limpieza y desinfección, al final de cada día la incidencia de listerias fue en aumento: 15 %, 30% y 40 % de las muestras colectadas fueron positivas a *Listeria* a los 3, 6, y 8 días, respectivamente, después de la limpieza y desinfección con amonio cuaternario (Gravani, 1999).

La quesería D tuvo la menor frecuencia de aislamiento de *Listeria* (7%), solo 6 de los 24 puntos de muestreo fueron positivos y, en un período de 17 meses únicamente en 3 ocasiones se aisló *L. innocua* de este lugar (Cuadros 9 y 18). A diferencia de las queserías A, B y C, en la quesería D dentro de sus prácticas de limpieza se observó el empleo frecuente de jabón y el cepillado del piso y las superficies empleadas en la elaboración y almacenamiento de quesos así como la aplicación de tratamientos térmicos superiores a 70 °C a una parte del equipo cada tercer día y el vaciado de agua o suero caliente al menos una vez al día al drenaje (Cuadro 14). Consideramos que estas prácticas explican la baja frecuencia de *Listeria* encontrada en esta quesería.

Para disminuir el nivel de contaminación de *L. monocytogenes* en una planta procesadora de trucha ahumada llevaron a cabo los siguientes procedimientos: (a) limpiaron, desinfectaron y sometieron el equipo a temperaturas de 80 °C y (b) la línea de producción, pisos y paredes fueron tratadas con vapor caliente; los autores concluyen que el vapor, aire y agua caliente son herramientas útiles en la limpieza para eliminar *L. monocytogenes* de plantas de pescado, pues en los 5 meses posteriores a este tratamiento, ninguna de las muestras de la solución de salmuera o de los productos fue positiva a *Listeria* (Autio *et al.*, 1999).

El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos de control (ARPCP por sus siglas en español o HACCP, por sus siglas en inglés) es una forma de abordar y asegurar la inocuidad de los alimentos que puede ser usada para identificar y controlar riesgos físicos químicos y biológicos en los alimentos (ICMSF, 1988; Gravani, 1999). Este sistema señala que un punto crítico de control es un lugar, una práctica, un procedimiento o un proceso en el que puede ejercerse control sobre uno o más factores, que si son controlados, podría reducirse al mínimo o prevenirse un peligro o riesgo (ICMSF, 1988).

Listeria monocytogenes es destruida cuando se expone a temperaturas de 70 °C durante 4.6 ± 0.5 segundos (Bunning *et al.*, 1992, citados por Lou y Yousef, 1999). Los tratamientos térmicos empleados en la quesería D son superiores a esta temperatura por lo que pueden constituir un punto crítico de control de *L. monocytogenes* en queserías artesanales.

V. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El piso y el refrigerador son las fuentes principales de contaminación con *Listeria* en las queserías artesanales.

El equipo empleado y las maniobras realizadas contribuyen de manera importante en la contaminación de los quesos frescos durante su elaboración.

En las queserías artesanales, algunas especies y serotipos e incluso cepas de *Listeria* pueden persistir y predominar durante mas de un año.

El empleo de tratamientos térmicos mayores de 70°C en el equipo, conjuntamente con el uso de jabón y cepillado frecuente de pisos y superficies pueden constituir medidas factibles y efectivas para el control de *Listeria* en queserías artesanales.

VI. LITERATURA CITADA

- Angelidis A.S., L. T. Smith, and Smith G.M. 2002. Elevated carnitine accumulation by *Listeria monocytogenes* impaired in glycine betaine transport is insufficient to restore wild-type cryotolerance in milk whey. *Int J Food Microbiol* 75: 1 - 9 (Abstract).
- Annous B.A., L.A. Becker, D.O., Bayles, D.P., Labeda and B.J., Wilkinson. 1997. Critical role of anteiso-C_{15:0} fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 63: 3887-3894.
- Arbeit R.D. 1999. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: *Manual of clinical microbiology* 7th edition. Ed. ASM, Washington. 1773p.
- Armstrong D., and P.C. Fung. 1992. Brainstem encephalitis (rhombencephalitis) due to *Listeria monocytogenes*: case report and review. *Clin Infec Dis*. 16: 689 - 702.
- Armstrong D. 1995. *Listeria monocytogenes*. In: *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases* 4th edition. Edited by Mandell G.L., Bennett J.E., and Dolin R. Churchill Livingstone. New York. 2916p.
- Aureli P, C.G. Fiorucci, D. Caroli, G. Marchiaro, O. Novara, L.Leone, and S. Stefania. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *N Engl J Med* 342: 1236 -1241.
- Autio T, S. Hielm, M. Miettinen, A.M. Sjöberg, K. Aarnisalo, J. Björkroth, T. Mattila-Sandholm and H. Korkeala. 1999. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. *Appl Environ Microbiol* 65: 150 -155.
- Barriga Angulo G., N.P. Castillo Torres, L. Rojas Molina. 1997. Meningoencefalitis etiología en 2121 casos confirmados bacteriológicamente. *Patología Clínica* 44: 241 - 244.
- Bayles D.O, A. Bassam and B.J. Wilkinson. 1996. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* in response to temperature downshock and growth at low temperatures. *Appl Environ Microbiol* 62: 1116 - 1119.

- Becker L. A., M. Sevket Çetin, R.W. Hutkins and A.K. Benson. 1998. Identification of the gene coding the alternative sigma factor σ^b from *Listeria monocytogenes* and its role in osmotolerance. J Bacteriol 180: 4547 - 4554.
- Becker L.A., S.N. Evans, R.W. Hutkins and A.K. Benson. 2000. Role of σ^b in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. J Bacteriol 182: 7083 - 7087.
- Bourry A., and B. Poutrel. 1996. Bovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* kinetics of antibody responses in serum and milk after experimental infection. J Dairy Sci 79: 2189 - 2195.
- Bourry A., T. Cochard and B. Poutrel. 1997. Serological diagnosis of bovine, caprine and ovine mastitis caused by *Listeria monocytogenes* by using an enzyme-linked immunosorbent assay. J Clin Microbiol 35: 1606 - 1608.
- Beumer R.R., M.C. Te Giffel, L.J. Cox, F.M. Rombouts, and T. Abee. 1994. Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine on growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. Appl Environ Microbiol 60: 1359 - 1363.
- Boerlin P., F. Boerlin-Petzold, E. Bannerman, J. Bille and T. Jemmi. 1997. Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases. Appl Environ Microbiol 63: 1338 - 1343.
- Bubert A., M. Kuhn, W. Goebel and S. Kohler. 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. J Bacteriol 174: 8166 - 8171. (Abstract).
- Buchanan R.L., H.G. Stahl and D.L. Archer. 1987. Improved plating media for simplified, quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Food Microbiol 4: 269 - 275.
- Bishop J.R., G.F. Senyk and S.E. Duncan. 1992. Detection of antibiotic/drug residues in milk and dairy products. In: Standard methods for the examination of dairy products. Edited by Marshall R.T. American Public Health Association. Washington D C. 547 p.

- Boggs J.D., R.E. Whitwam, L.M. Hale, R.P. Briscoe, S.E. Kahn, J.M. Maillard, J.W. Reardon and J.R. Saah. 2001. Outbreak of listeriosis associated with homemade mexican-style cheese - North Carolina, October 2000 - January 2001. JAMA 286: 664 - 665.
- Bonfil A.A., S.L. Sánchez, A.L. Pineda, y G.D. Villanueva. 1999. Listeriosis neonatal. Reporte de tres casos. Bol Med Hosp Infant Mex 47: 437 - 438.
- Bracegirdle P., A.A. West, M.S. Lever, R.B. Fitzgeorge and A. Baskerville. 1994. A comparison of aerosol and intragastric routes of infection with *Listeria* spp. Epidemiol Infect 112: 69 - 79.
- Campoy C., R. Bayés., M. Rivero() (sic), and J.A. Molina-Font. 1997. Ranges of carnitine deficiency and insufficiency in breast and formula fed infants. 144. Pediatric Research 42: 409.
- Cassiday P.K., R.E. Brackett and L.R. Beuchat. 1989. Evaluation of three newly developed direct plating media to enumerate *Listeria monocytogenes* in foods. Appl Environ Microbiol 55: 1645 - 1648.
- Castrejón Alba M.M., y T. Mateo Balmelli. 1997. Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* en niños inmunocomprometidos. Bol Med Hosp Infant Mex 54: 76 - 80.
- Cotton L.N., and C.H. White. 1992. *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella* in dairy plant environments. J Dairy Sci 75: 51 - 57.
- Cox L. J., J.L. Cordier., C. Cordellana, P. Konkell, C. Pedrazzini, Rl Beumer, and A. Siebenga. 1989. *Listeria* spp. in food processing, non -food and domestic environments. Food Microbiol 6: 49-61.
- Craig D. B., C. Austin, J. Sobel, P.S. Hayes, W.F. Bibb, L. M. Graves, B. Swaminathan, M.E. Proctor, and P.M. Griffin. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. N Engl J Med 336: 100 - 105.
- Cullor J.S. 1992. Test for identifying antibiotic residues in milk: How well do they work. Veterinary Medicine 87: 1235 - 1241.

- Charpentier E., and P. Curvalin. 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrob Agents Chemother 43: 2103 - 2108.
- Davis Ch. 1993. Listeriosis y Erisipeloide. En: Medicina Interna Kelley. 2ª Ed. Panamericana, Argentina. 2856p.
- Doyle M.P. 1988. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. Food Technol (Sin volumen): 169- 171.
- Dramsí S., S.Levi, A. Triller, and P. Cossart. 1998. Entry of *Listeria monocytogenes* into neurons occurs by cell-to-cell spread: an in vitro study. Infect and Immun 66: 4461 - 4468.
- Drevets D.A. 1997. *Listeria monocytogenes* infection of cultured endothelial cells stimulates neutrophil adhesion and adhesion molecule expression. J Immunol 158: 5305 - 13 (Abstract).
- ERS - Economic Research Service- United States Department of Agriculture. 2002. Economics of foodborne disease: *listeria (sic) monocytogenes*. Disponible en: [http://www.ers.usda.gov/briefing/Foodborne Disease/listeria/](http://www.ers.usda.gov/briefing/Foodborne%20Disease/listeria/) Accesado el 21/06/02.
- Eilertz Y., M.L. Danielsson-Tham, E. Hammarberg, W. Reeves, J. Rocourt, H.P.R. Seeliger, V.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.
- Eklund M.L., F.T. Poysky, R.N. Paranjpye, L.C. Lashbrook, M.E. Peterson and G.A. Pelroy. 1995. Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoke fishery products and processing plants. J Food Prot 58: 502 - 508.
- El - Shenawy M.A., and Marth E.H. 1989. Behavior of *Listeria monocytogenes* in the presence of sodium propionate. Int J Food Microbiol 8: 85 - 94.
- Ericsson H., A. Eklöv, M.L. Danielsson Tham, S. Loncarevic, L.O. Mentzing, Y. Persson, H. Unnerstad and W. Tham. 1997. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. J Clin Microbiol 35: 2904 - 2907.

- Escárcega H., R. Peñaloza, O. Montes, R. Peña, H. Godoy, M. Negrin, R. Rodríguez, P. Anaya. 1999. Listeriosis materno-fetal: reporte de tres casos. *Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría*. 6(35) : 290 - 296.
- Facinelli B., E. Giovanetti, P.E. Varaldo, P. Casolari, U. Fabio. 1991. Antibiotic resistance in foodborne listeria. *Lancet* 338: 1272.
- Farber J.M. and P.L. Peterkin. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* 55: 476 - 511.
- Fenlon D.R. 1999. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: *Listeria, listeriosis and food safety*. Edited by: Ryser E.T., and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York 1999. Pp: 21 - 37.
- Fehlhaber K, y Janetschke. 1992. Higiene veterinaria de los alimentos. Acribia. Zaragoza. 669p.
- Fleming D.W., S.L. Cochi, K.L. Mac Donald, J.Brondum, P.S. Hayes, B.D. Plikaytis, M.B. Holmes, A. Audrier, 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.
- Fuchs S., D. Hochner-Celnikier and O. Shalev. 1994. First trimester listeriosis with normal fetal outcome. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 13: 656 - 658.
- Gabis D.A., R. S. Flowers, D. Evanson, and R.E. Faust. 1989. A survey of 18 dry dairy product processing plant environments for *Salmonella*, *Listeria* and *Yersinia*. *J Food Prot* 52: 122 - 124.
- García Ramírez C. 1996. De Kiosco en Kiosco: Tapalpa (Documental para Televisión). Conductor: Cornelio García Ramírez. Productor: Mario Robles. Sistema Jalisciense de Radio y Televisión, Canal 7. Guadalajara, Jal. México. 30 minutos.
- García Ramírez C. 2002. De Kiosco en Kiosco: Jilotlán de los Dolores. (Documental para Televisión). Conductor: Cornelio García Ramírez. Productor: Mario Robles "El Huarro". Sistema Jalisciense de Radio y Televisión, Canal 7. Guadalajara, Jal. México. 30 minutos.

- 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.
- Grace B., G.A. Houghtby, H. Rudnick and K. Whaley. 1992. Sampling dairy and related products. In: *Standard methods for the examination of dairy products*. Edited by Marshall R.T. American Public Health Association. Washington D C. Pp: 59 - 83
- Greenwood M.H., D. Roberts, and P. Burden. 1991. The occurrence of *Listeria* species in milk and dairy products: a national survey in England and Wales. *Int J Food Microbiol* 12: 197 - 206.
- Goulet V., H. Valk de, O. Pierre, F. Stainer, J. Rocourt, V. Vaillant, Ch. Jacquet, J-C. Desenclos. 2001. Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987 -1997. *Emerg Infect Dis* 7: 983 - 989.
- Gran Enciclopedia Larousse, Tomo 2 1990. Artesanal y Artesanía. 3ª Ed. Planeta. Barcelona.
- Griffiths M.W. 2000. Milk and unfermented milk products. In: *The microbiological safety and quality of food*, Volume I. Edited by: Lund B.M., T. C. Baird-Parker, G.W. Gould. Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, Maryland. Pp: 507-534.
- Gravani R. 1999. Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities. In: *Listeria, listeriosis and food safety*. Edited by: Ryser E.T., and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York 1999. 738 p.
- Hassan L., O. Mohammed, P. L. McDonough and R.N. González. 2000. A cross-sectional study of the prevalence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in New York dairy herds. *J Dairy Sci* 83: 2441 - 2447.
- Herbert KC., S:J.Foster. 2001. Starvation survival in *Listeria monocytogenes*: characterization of the response and the role of known and novel components. *Microbiology* 147: 2275 - 2284.
- Hitchins A.D. 1995. *Listeria monocytogenes*. In: *Bacteriological Analytical Manual* 8th edition. AOAC International. Arlington VA. Pp: 10.01-10.13.

- Hof H., T.Nichterlein and M.Kretschmar. 1997. Management of listeriosis. Clin Microbiol Rev 10: 345 - 357.
- INEGI - Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática - 2001. Encuesta Industrial Mensual. Enero - Abril. INEGI. Aguascalientes, Aguascalientes.
- INEGI - Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática - 2002. El Sector Alimentario en México. INEGI. Aguascalientes, Aguascalientes. 320p.
- ICMSF- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1991. El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos, su aplicación a las industrias de alimentos. Acribia, Zaragoza. 331 p.
- Isom L.L., S. Zubin, S. Khambatta, J.L. Moluf, D.F. Akers and S.E. Martin. 1995. Filament formation in *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 58: 1031 - 1033.
- Jay J.M. 1994. Microbiología moderna de los alimentos. 3ª Ed. Acribia, Zaragoza. 804p.
- Jacquet Ch., J. Rocourt, and A. Reynaud. 1993. Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated. Int J Food Microbiol 20: 13 - 22.
- Jones E.M., and A.P. MacGowan. 1995. Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 14: 165 -175.
- Jornada-Krebs V.L., E.M. Albuquerque-Diniz de, M.E. Jurfest Ceccon, Nadia Nader Mangini, J.L., Araujo Ramos, y F.A. Costa Vaz. 1997. Secuelas auditivas de meningitis bacteriana neonatal: estudio de 32 recién nacidos de término. Bol Med Hosp Infant Méx 54: 369 - 373.
- Juneja V.K., T.A. Foglia, and B.S. Marmer. 1998. Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* : Effect of pH, acidulant, and growth temperature. J Food Prot 61: 683 - 687.

- Kells J.M. and A. Gilmour. 2002. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* in milk processing environments. En: Memorias del 4to. Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos, XIX Reunión Nacional de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jalisco. Pp: 115.
- Kerr K.G., D. Birkenhead, K. Seale, J. Major, and P.M. Hawkey. 1993. Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers. *J Food Prot* 56: 525 - 527.
- Kihm D.J., G.J. Leyer, G.H. An, and E. A. Johnson. 1994. Sensitization of heat-treated *Listeria monocytogenes* to added lysozyme in milk. *Appl Environ Microbiol* 60: 3854 - 3861 (Abstract).
- Klein W., H. Michael, W. Weber and M.A. Marahiel. 1999. Cold shock response of *Bacillus subtilis*: Isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J Bacteriol* 181: 5341 - 5349.
- Ko R., L.T. Smith, and G.M. Smith. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and criotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 176: 426 - 431 (Abstract).
- Kornacki J.L., D.J. Evanson, W. Reid, K. Rowe, and R.S. Flowers. 1993. Evaluation of the USDA protocol for detection of *Listeria monocytogenes*. *J Food Prot* 56: 441 - 443.
- Klausner R.B., and C.W. Donnelly. 1991. Environmental sources of *Listeria* and *Yersinia* in Vermont dairy plants. *J Food Prot* 54: 607 - 611.
- Kraus A., A.R. Cabral, J. Sifuentes Osornio, and D. Alarcon Segovia. 1994. Listeriosis in patients with connective tissue diseases. *J Rheumatol*. 21: 635 - 638.
- Lan Z., F.Fiedler, and S. Kathariou. 2000. A sheep in wolf's clothing: *Listeria innocua* strains with teichoic acid-associated surface antigens and genes characteristic of *Listeria monocytogenes* serogroup 4. *J Bacteriol* 182: 6161 - 6168.
- 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.

- Liu S., J.E. Graham, L. Bigelow, P.D. Morse, and B.J. Wilkinson. 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol* 68: 1696 - 1705.
- Loncarevic S., W. Tham, M.L. Danielsson Tham. 1996. The clones of *Listeria monocytogenes* detected in food depend on the method used. *Lett Appl Microbiol* 22: 381 - 384.
- Loncarevic S., M.L. Danielsson-Tham, L. Mårtensson, Å. Ringnér, and W. Tham. 1997. A case of foodborne listeriosis in Sweden. *Lett Appl Microbiol* 24: 65 - 68.
- Lou Y., and A.E. Yousef 1997. Adaptation to sublethal environmental stresses protects *Listeria monocytogenes* against lethal preservation factors. *Appl Environ Microbiol* 63: 1252 - 1255.
- Lou Y., and A.E. Yousef. 1999. Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: *Listeria, listeriosis and food safety*. Edited by: Ryser E.T., and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp: 131 - 224.
- 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. 1988. *Listeria* isolation, revised method of analysis. *FDA Federal Register*, 53 (211): 44148 - 44153.
- Luis Juan Morales A., R. Alaniz de la O, y M.E. Vázquez Sandoval, M.E. 1992a. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco tipo panela que se expende en mercados de Guadalajara, Jal. Resúmenes del XXIII Congreso Nacional de Microbiología. Acapulco, México. Pp: M26.
- Luis Juan Morales A., M.E. Vázquez Sandoval, y R. Alaniz de la O. 1992b. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco tipo rancho que se expende en mercados de Guadalajara, Jalisco. Resúmenes de la IX Reunión Anual de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal. Pp: 19.

- Luis Juan Morales A. 1994. *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y su importancia en la salud pública. Tesis de Maestría. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara, México.158p.
- Luis Juan Morales A., R. Alaniz de la O, M.E. Vázquez Sandoval, and B.T. Rosas Barbosa. 1995. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, Mexico. J Food Prot 58: 1139 - 1141.
- Lund, A.M., E.A. Zottola, and D.J. Pusch. 1991. Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk. J Food Prot 54: 602 - 606.
- Lyytikäinen O., T. Autio, R. Majjaka, P.Ruutu, T. Honakanen-Buzalski, M. Miettinen, M. Hatakka, J. Mikkola, V.J. Anttila, t. Johansson, L. Rantala, T. Aalto, H. Korkeala and A. Siitonen. 2000. An outbreak of *Listeria monocytogenes* serotype 3a infections from butter in Finland. J Infec Dis 181: 1838 - 1841.
- Marrufo Olivares C., N. C. Arias, L. Escalante Zapata, J.M. Pino Rosado, W. Herrera, F. Vargas Quintal, J.L. Caceres Solis, C. Ortegon Zapata, I. Alonzo, G. Dzib Rosado, J. Cuervo Mogueifco, J. Flores Abuxapqui y M.A. Puc Franco. 2000. Identificación de los gérmenes causantes de sepsis neonatal temprana en niños de alto riesgo en el estado de Yucatán. Rev Biomed 11: S31 - S32.
- Mascola L., F. Sorvillo, V. Goulet, B. Hall, R. Weaver, and M. Linnan. 1992. Fecal carriage of *Listeria monocytogenes*, - Observations during a community-wide, common source outbreak. Clin Infect Dis 15: 557 - 558.
- 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.
- McLauchlin J., and J.C. Low. 1994. Primary cutaneous listeriosis in adults: an occupational disease of veterinarians and farmers. Vet Rec 135: 615 - 617.
- Mc Lauchlin J. 1997. Animal and human listeriosis: a shared problem?. Vet J 153: 3 - 5.

- Maturin L.J. 1995. Inhibitory substances in milk. In: Bacteriological Analytical Manual 8th edition. AOAC International. Arlington VA. Pp: 20.01 - 20.06.
- Mead P.S., L. Slutsker, V. Dietz, L.F. Mc Caig, J.S. Bresee, C. Shapiro, P.M. Griffin, and R.V. Tauxe. 1999. Food -related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607 - 625.
- Mezcle J.F., y J. Zucca. 1994. Origen de los microorganismos en los alimentos. En: Microbiología alimentaria, Volumen I: Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Coordinado por: Bourgeois C.M., J.F. Mezcle, y J. Zucca. Acribia, Zaragoza. Pp: 9 - 15.
- Miettinen M.K., A. Sitonen, P. Heiskanen, H. Haajanen, K.J. Björkroth, and H.J. Korkeala. 1999. Molecular epidemiology of and outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. *J Clin Microbiol* 37: 2358 - 2360.
- Montes O. M .G., G. Rodríguez, P. Casaubón, C.L. Aldrete, M.L. Molinar, R. Ángeles, R. Hernández, R. Peña. 1999. Listeriosis neonatal: reporte de un caso. *Pediatría* 6 (34): 240 - 244.
- O'Driscoll B., G. Cormac, M. Gahan, and C. Hill. 1996. Adaptative acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an acid-tolerante mutant which demonstrates increased virulence. 1996. *Appl Environ Microbiol* 62: 1693 - 1698.
- OPS - Organización Panamericana de la Salud -. 2002. Nuevos rumbos para la salud en las Américas: Informe del Director. OPS. Edición del Centenario.(Documento Oficial No. 306) Washington DC. 176p.
- Pini, P.N., and R.J. Gilbert. 1988. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Int J Food Microbiol* 6: 317 - 326.
- Pinner R.W., A. Schuchat, B. Swaminathan, P.S. Hayes, K.A. Deaver, R.E. Weaver, B.D. Pilkaytis, M. Reeves, C.V. Broome, J. D. Wenger, and the Listeria study group. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis. II Microbiologic and epidemiologic investigation. *JAMA* 267: 2046 - 2050.

- 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.
- Pritchard T.J., C.M. Beliveau, K.J. Flanders, and C.W. Donnelly. 1994. Increased incidence of *Listeria* species in dairy processing plants having adjacent farm facilities. J Food Prot 57: 770 - 775.
- Pron B., C. Boumaila, L. Jaubert, S. Sarnacki, J.P. Monnet, P. Berche and J.L. Gaillard. 1998. Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. Infect Immun 66: 747 - 755.
- Ramírez Aguilar A., A. Pérez Miravete y S. Trejo. 1967. Investigación de *Listeria monocytogenes* en niños con diagnóstico de meningoencefalitis. Bol méd Hosp infant (Mex) 24: 655 - 658.
- Riedo F.X., R.W. Pinner, M.L. Tosca, M.L. Cartter, L.M. Graves, M.W. Reeves, R.E. Weaver, B.D. Plikaytis, and C.V. Broome. 1994. A point source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. J Infect Dis 170: 693 - 696.
- Riviera L., F. Dubini, and M.G. Bellotti. 1993. *Listeria monocytogenes* infections : the organism, its pathogenicity and antimicrobial drugs susceptibility. Microbiologica 16: 189 - 204.
- Rocourt J., and P. Cossart. 1997. *Listeria monocytogenes*. In: Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. Edited by: Doyle M., L.R. Beuchat, and T.J. Montville. ASM Press. Washington D.C. 768 p.
- Rocourt J. 1999. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Edited by: Ryser E.T., and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp: 1 - 20.
- Rowan N.J., A. A. G. Candlish, A. Bubert, J.G. Anderson, K. Kramer and J. McLauchlin. 2000. Virulent rough filaments of *Listeria monocytogenes* from clinical and food samples secreting wild type levels of cell free p60 protein. J Clin Microbiol 38: 2643 - 2648.

- Ruiz A., y J. Estupiñan. 1992. Organización de los servicios de salud pública veterinaria en América Latina y el Caribe. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 11: 117 - 146.
- Ryser E.T., and E.H. Marth. 1991. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. Marcel Dekker, Inc., New York. 632 p.
- Ryser E.T., S.M. Arimi, M.M.C. Bunduky, and C. W. Donnelly. 1996. Recovery of different *Listeria* ribotypes from naturally contaminated, raw refrigerated meat and poultry products with two primary enrichment media. *Appl Environ Microbiol* 62: 1781 - 1787.
- Ryser E.T. 1999a. Foodborne listeriosis. In: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Edited by: Ryser E.T., and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp: 299 - 358.
- Ryser E. T. 1999b. Incidence and behavior of *Listeria monocytogenes* in unfermented dairy products. In: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Edited by: Ryser E.T., and E.H. Marth. 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: *Listeria*, Listeriosis and Food Safety. Edited by: Ryser E.T., and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp: 411 - 503.
- Sánchez Rebolledo J.M., A. Martínez Ruiz y D. Bessudo M. 1965. Un caso de meningitis purulenta producida por *Listeria monocytogenes* (*sic*). *Bol méd Hosp infant (Mex)* 22: 231 - 324.
- Schlech III 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.
- Schönberg A. , and K. Gerkkg. 1991. *Listeria* in effluents from the food-processing industry. *Rev sci tech Off int Epiz* 10: 787 - 797.
- Schuchat A., K.A. Deaver, J.D. Wenger, B.D. Pilkaytis, L. Mascola, R. Pinner, A.L. Reingold, C.V. Broome and the *Listeria* study group. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis. I. Case-control study of dietary risk factors. *JAMA* 267: 2041 - 2045.

- Schuchat A., K.Deaver, P.S. Hayes, L. Graves, L. Mascola and Jay D. Wenger. 1993. Gastrointestinal carriage of *Listeria monocytogenes* in household contacts of patients with listeriosis. *J Infect Dis* 167: 1261 - 1262.
- SECRETARIA DE SALUD. 1999. Norma Oficial Mexicana NOM- 017-SSA-1994, Para la Vigilancia Epidemiológica. Diario Oficial de la Federación. México D.F. 2 de septiembre de 1999. Pp: 53 - 81
- Seeliger H.P.R. and D. Jones. 1986. Genus *Listeria* Pirie 1940. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 2. Edited by: Sneath P.H.A., N.S. Mair, N.E. Sharpe and J.G. Holt . Williams & Wilkins, Baltimore. Pp: 788 - 795.
- Siegman-Igra Y., R. Levin, M. Weinberg, Y.Golan, D. Schwartz, Z. Samra, H. Konigsberg, A. Yinnon, G. Rahav, N. Keller, N. Bidharat, J. Karpuch, R. Finkelstein, M. Alkan, Z. Landau, J. Novikov, D. Hassin, C. Rudnicki, R. Kitzes, S. Ovadia, Z. Shimoni, R. Lang, and T. Shohat. 2002. *Listeria monocytogenes* infection in Israel and review of cases worldwide. *Emerg Infect Dis* 8: 305 - 310.
- Sinell, H.G. 1980. Introducción a la higiene de los alimentos. Acribia, Zaragoza. 167 p.
- Skogberg K., J. Syrijänen, M. Jahkola, O.V. Renkonen, J. Paavonen, J. Ahonen, S. Kontianen, P. Rutu, and V. Valtonen. 1992. Clinical preservation and outcome of listeriosis in patients with and without immunosuppressive therapy. *Clin Infect Dis* 12: 815-21.
- Slutsker L., and A. Schuchat. 1999. Listeriosis in humans. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Edited by: Ryser E.T., and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp: 75 - 95.
- Smith J., and P. M. Fratamico. 1995. Factors involved in the emergence and persistence of food-borne diseases. *J Food Prot* 58: 696 - 708.
- Siragusa G.R., and M.G. Johnson. 1989. Inhibition of *Listeria monocytogenes* growth by the lactoperoxidase-thiocyanate-H₂O₂ antimicrobial system. *Appl Environ Microbiol* 55: 2802 - 2805.
- Slade P.J. 1992. Monitoring *Listeria* in the food production environment. I. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. *Food Res Inter* 25: 45 - 56.

- Solórzano Santos F., J.L. Arredondo García, E. Udaeta Mora, F.J. Ortíz Ibarra, F. Echániz Avilés, M. Beltrán Zuñiga. 1989. Infección sistémica neonatal por *Listeria monocytogenes*. Bol Med Hosp Infant Mex 46: 709 - 714.
- Swaminathan B., P.S. Hayes, V.A. Przybyszewski, and B.D. Pilkaytis. 1988. Evaluation of enrichment and plating media for isolating *Listeria monocytogenes*. J Assoc Off Anal Chem 71: 664 - 668.
- Tappero J.W., A. Schuchat, K.A. Deaver, L. Mascola, J.D. Wenger, for the listeriosis study group. 1995. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States: Effectiveness of prevention efforts? JAMA 273: 1118 - 1122.
- Tompkin R. B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. J Food Prot 65: 709 - 725.
- Troxler R., A. Gravenitz von, G. Funke, B. Wiedemann and I. Stock. 2000. Natural antibiotic susceptibility of *Listeria* species: *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* strains. Clinical Microbiol Infect 6: 525 - 535.
- Valk H. de., V.Vaillant, C. Jacquet, R. Le Querrec, F. Stainer, N. Quelquejeu, O. Pierre, V. Desenclos, and V. Goulet. 2001. Two consecutive nationwide outbreaks of listeriosis in France, October 1999- February 2000. Am J Epidemiol 154: 944 - 950.
- Vázquez Boland J.A., M. Kuhn, P. Berche, T. Chakroborty, G. Domínguez Bernal, W. Goebel, B. González Zorn, J. Wehland and J. Kreft. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin Microbiol Rev 14: 584 - 640.
- Vázquez Salinas C., O. Rodas Suárez and E.I. Quiñones Ramírez. 2001. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. Food Microbiology 18: 177 - 181.
- Verheul A., E. Glaasker, B. Poolman and T. Abee. 1997. Betaine and L-Carnitine transport by *Listeria monocytogenes* Scott A in response to osmotic signals. J Bacteriol 179: 6979 - 6985.

- Vicente M.F., J.C. Pérez Díaz, F. Baquero, M.A. Pedro de, and J. Berenguer. 1990. Penicillin-binding protein 3 of *Listeria monocytogenes* as the primary lethal target for beta-lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 539 - 542.
- Vizcaino Forcada L. y M. Mustre de León. 1992. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos. En: Resúmenes de la IX Reunión Anual de Microbiología, Higiene y Toxicología de los Alimentos. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, Jal. Pp: 31.
- Wilson R.L., A.R. Tvinnereim, B.D. Jones, and J.T. Harty. 2001. Identification of *Listeria monocytogenes* in vivo-induced genes by fluorescence-activated cell sorting. *Infect Immun* 69: 5016 - 5024.
- Wing E.J., and S.H. Gregory. 2002. *Listeria monocytogenes*: Clinical and experimental update. *J Infect Dis* 185 (Suppl 1): S18 - 24.
- Wells J.G., G.K. Morris, and P.S. Brachman. 1971. New method of isolating *Salmonellae* from milk. *Appl Microbiol* 21: 235 - 239.
- Wesley I. 1999. Listeriosis in animals. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Edited by: Ryser E.T., and E.H. Marth. Marcel Dekker, Inc. New York. Pp: 39 - 73.
- Wong Lee A.C. 1998. Biofilms in food processing environments. *J Dairy Sci* 81: 2765 - 2770.
- Zheng W., and S. Kathariou. 1995. Differentiation of epidemic associated strains of *Listeria monocytogenes* by restriction fragment length polymorphism in a gene region essential for growth at low temperatures (4 °C). *Appl Environ Microbiol* 61: 4310 - 4314.

ANEXO

**Caracterización molecular de aislamientos de *L. monocytogenes*
procedentes de las queserías A y C**

De acuerdo con los resultados enviados por el Dr. Paul M.V. Martin, del Instituto Pasteur, no hay diferencia entre los aislamientos de *L. monocytogenes* serotipo 1/2b obtenidos en la quesería A en febrero de 1999, agosto de 1999, septiembre de 2000 y octubre de 2000 (Figuras 7 y 9).

Con relación a la quesería C, en las figuras 8 y 9, se observa que con la enzima *Ascl* pueden apreciarse patrones de DNA idénticos en 2 aislamientos de *L. monocytogenes* serotipo 4b procedentes de canastos para panela (obtenidos en mayo y agosto de 1999) y el encontrado en panela en septiembre de 2000.

Empleando la endonucleasa *Apal* se observa una similitud entre el aislamiento de *L. monocytogenes* serotipo 4b hecho en septiembre de 2000 a partir de panela y el aislamiento hecho de la escoba en agosto de 1999 (Figura 8).

Los fragmentos de restricción obtenidos con ambas enzimas, ponen de manifiesto las diferencias entre los patrones de DNA correspondientes a aislamientos de *L. monocytogenes* 4b procedentes de panela obtenidos en mayo de 1999, diciembre de 1999 y septiembre de 2000 (Figura 8).

En la figura 9, pueden apreciarse las diferencias entre el patrón de DNA observado en los aislamientos del serotipo 1/2b de la quesería A y los del serotipo 4b de la quesería C.

Patrones de DNA en aislamientos de *Listeria monocytogenes*

Los casos de listeriosis humana son causados principalmente por los serotipos 4b, 1/2a y 1/2b de *L. monocytogenes* (Farber y Peterkin, 1991). La presencia de estos serotipos durante 17-20 meses en las queserías A y C así como su correspondiente aislamiento a partir de los quesos elaborados en estos lugares (Cuadros 15 y 17) demuestran la existencia del riesgo de que puedan presentarse casos de listeriosis asociada al consumo de quesos procedentes de algunas queserías artesanales. Tompkin (2002), menciona 21 investigaciones en que se reportan cepas de *L. monocytogenes* de los serotipos 1/2, 1/2a, 3b y 4b que permanecieron en el medio ambiente del área de procesamiento de plantas de alimentos por períodos de 1 mes a 7 años.

La caracterización de cepas de *L. monocytogenes* en una fábrica de quesos en Francia empleando patrones de restricción para el gen rRNA sugirió que en esa fábrica, las cepas de *L. monocytogenes* aisladas pudieron derivar del mismo grupo ancestral, sugiriendo la implantación de una determinada cepa en la fábrica (Jacquet *et al.*, 1993).

Kells y Gilmour (2002) identificaron cepas de *L. monocytogenes* que fueron comunes en dos plantas de lácteos, sugiriendo que estas cepas pueden estar adaptadas para sobrevivir dentro del medio ambiente del área de procesamiento de leche.

Loncarevic *et al.* (1996), mediante análisis de enzimas de restricción (REA), encontraron cuatro muestras de pescado albergando la misma clona de *L. monocytogenes*; como los pescados de las cuatro muestras procedían de la misma planta y fueron procesados en el mismo mes, los autores deducen que una vez que una cepa de *L. monocytogenes* se ha establecido en una fábrica, los productos corren el riesgo de ser contaminados con esta cepa.

En una planta procesadora de salmón ahumado, investigaron la ocurrencia y fuentes de contaminación con *L. monocytogenes*, estas fueron identificadas y se determinó cerrar la planta para realizar una limpieza y desinfección que eliminara al patógeno. Los procedimientos llevados a cabo eliminaron a *L. monocytogenes* de la línea de procesamiento y del equipo, sin embargo, la recontaminación ocurrió poco después de haber reabierto la planta: la fuente primaria de contaminación resultó ser la superficie del pescado fresco o congelado que llegaba a esta fábrica (Eklund *et al.*,

1995). Este trabajo muestra la posibilidad de que en plantas de alimentos ocurran fuentes externas que continuamente aportan la misma especie de *Listeria*.

Los criterios actuales consideran de limitado valor epidemiológico la identificación serológica de *L. monocytogenes* por tener un bajo poder discriminatorio[†], recomendándose la identificación empleando técnicas de biología molecular cuando se busca establecer asociaciones entre fuentes y contaminación de alimentos o entre alimentos y pacientes (Boerlin *et al.*, 1997). Si bien estas técnicas son muy precisas, su ejecución e interpretación es laboriosa además de requerir equipo y personal especializado. Al carecer de recursos para llevarlas a cabo, solicitamos al Instituto Pasteur su participación para la identificación serológica y molecular de las cepas de *Listeria* aisladas en este trabajo. La respuesta del Instituto fue que por no ser de importancia en salud pública, se descartaba la identificación de cepas que no fueran *L. monocytogenes*.

Los resultados del análisis serológico de los aislamientos de *L. monocytogenes* de la quesería A mostraron la presencia de 3 serotipos cuya persistencia fue variable: el serotipo 4d solo fue aislado en una ocasión, el serotipo 1/2a fue detectado en distintas muestras en un lapso de 4 meses, en tanto que el serotipo 1/2b estuvo presente durante un período de 20 meses (Cuadro 15).

La similitud observada en los patrones de DNA genómico presentados por el serotipo 1/2b muestran que una clona de este serotipo se implantó en la quesería A contaminando los quesos ahí elaborados (Figura 7).

Habiéndose aislado en la quesería A tanto el serotipo 1/2a como el 1/2b, fue evidente la capacidad discriminatoria del análisis de patrones de DNA, al ubicar como 1/2b un aislamiento (chiquihuite 10-ago-99) reportado por el análisis serológico como 1/2 inmóvil (Cuadro 15 y Figuras 7 y 9).

El serotipo 4b fue el único encontrado en la quesería C (Cuadro 17). A la fecha no se ha concluido el estudio molecular de los aislamientos de este serotipo; al encontrarse diversidad de patrones, se están volviendo a analizar algunos aislamientos y se incluirán otros mas. Con la información disponible, puede comentarse que los patrones de DNA mostrados por el serotipo 4b evidencian la presencia de 3 clonas

[†] capacidad para diferenciar entre cepas no relacionadas (Arbeit, 1999)

evidencian la presencia de 3 clonas distintas: una aislada de canastos para panela, panela y posiblemente de la escoba y otras dos clonas aisladas de panela (Figuras 8 y 9). Los patrones de DNA observados en aislamientos a partir de canastos para panela (mayo y agosto de 1999), panela (septiembre de 2000) y escoba (junio de 1999), sugieren la implantación de al menos una clona del serotipo 4b en la quesería C.

En conjunto, los resultados del análisis molecular sugieren que aún con procedimientos similares de elaboración, existen condiciones en cada quesería que favorecen la presencia e implantación de ciertas cepas de *L. monocytogenes*.