



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Microbiología

**Análisis de la calidad sanitaria e investigación de patógenos
bacterianos (*Salmonella* sp. y *Listeria* sp.) en quesos frescos de venta
en mercados públicos en la zona Norte de la Ciudad de Puebla.**

TESIS

**Presentada como requisito para obtener el título de
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo**

Presentan:

p.Q.F.B. María Jaqueline García García.

p.Q.F.B Mariana Velázquez García.

Director de tesis:

M.S.P Carlos Cabrera Maldonado

Asesor de tesis:

M.C. Gloria León Tello

Mayo 2016.

“En tiempos de cambio, quienes estén abiertos al aprendizaje se adueñaran del futuro, mientras que aquellos que creen saberlo todo estarán bien equipados para un mundo que ya no existe.”

Eric Hoffer.

Nuestro agradecimiento a:

Dr. Juan Xicohtencatl Cortés

Dra. Sara Ariadna Ochoa Pérez y su equipo de colaboradores

Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Quienes realizaron la confirmación de la cepa presuntiva *Listeria* sp., identificadas por el método automatizado de Vitek vr.2.0.

L. seeligeri (95%)

DEDICATORIA:

Queremos dedicar la siguiente tesis a Guillermo y Amalia, por haber sido los pilares de nuestras vidas y habernos enseñado a continuar este camino aun con todas las dificultades que hemos ido encontrando a lo largo de él. Todo el trabajo detrás de este documento fue hecho para cumplir un anhelo postergado, y sabemos que aunque físicamente no están presentes, desde allá donde se encuentran sienten la dicha de vernos culminar una etapa juntas. Con todo nuestro amor y respeto para ustedes.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios, por habernos permitido llegar al día de hoy y ver culminado el esfuerzo de lo que parece ser toda una vida.

A Facundo, por ser un buen padre y esposo. Por la comprensión de esta sorpresa tan bien guardada durante los últimos meses...

A Magdalena, por haber sido cómplice de este trabajo y por todo su apoyo.

Al Maestro Carlos Cabrera Maldonado por habernos abierto las puertas de su laboratorio, por la confianza depositada y todo el conocimiento y comprensión que nos brindó a lo largo de este proyecto. Sin usted jamás habríamos llegado hasta aquí.

A nuestro jurado, Maestra Alma López García, Maestra Reyna de Dios Amiray Pinzón y Doctora Martha de los Ángeles Lobo Sánchez, por las horas que invirtieron en la mejora de nuestro trabajo.

A todas las personas que han estado presentes de alguna manera apoyándonos en este proyecto, sin olvidar a nadie.

INDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Marco teórico	2
2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs)	2
2.2 Productos lácteos	2
2.3 Queso fresco	3
2.4 Control microbiológico	3
2.4.1 Mohos y levaduras	3
2.4.2 Coliformes totales	4
2.4.2.1 Coliformes fecales	4
2.4.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	5
2.5 <i>Salmonella</i> sp.	6
2.6 <i>Listeria</i> sp.	8
2.6.1 Características de la enfermedad	10
2.6.2 Patogenia	11
2.6.3 Transmisión	12
2.6.7 Identificación	12
3. Marco de referencia	13
4. Planteamiento del problema	16
5. Justificación	17
6. Objetivos	18
6.1 Objetivo general	18
6.2 Objetivos específicos	18
7. Diseño de la investigación	19
7.1 Tipo de estudio	19
7.2 Universo del estudio	19
7.3 Tamaño de la muestra	19
7.4 Toma de muestra	19
7.5 Sede y lugar de estudio	19

7.6 Criterios de inclusión	19
7.7 Criterios de exclusión	20
7.8 Criterios de eliminación	20
7.9 Recursos humanos	20
7.10 Recursos financieros	20
7.11 Análisis estadístico de la información	20
8. Materiales y metodología	21
8.1 Recursos materiales	21
8.2 Metodología	21
Diagrama No.1 Esquema general de trabajo	22
Diagrama No.2 Recuento de mohos y levaduras en alimentos	23
Diagrama No.3 Determinación de coliformes fecales por la técnica del número más probable	24
Diagrama No.4 Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Diagrama No.5 Investigación de <i>Salmonella</i> sp.	26
Diagrama No.6 Investigación de <i>Listeria</i> sp.	27
9. Resultados y discusión de resultados	28
10. Conclusiones	39
11. Bibliografía	40
12. Anexos	44

RESUMEN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son uno de los principales problemas de salud pública; sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce el origen. Se puede emplear el número o el tipo de microorganismos presentes en un alimento para evaluar su calidad y seguridad microbiológica; de la misma manera es importante tomar en consideración otros microorganismos patógenos para el ser humano y que al ser ingeridos con los alimentos pueden causar serios problemas de salud, como pueden ser algunos de los pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*; por mencionar algunos. El presente trabajo se realizó bajo las normas establecidas por la Secretaría de Salud para la cuenta de hongos y levaduras, determinación de coliformes fecales por la técnica del número más probable, determinación de *S. aureus*, *Salmonella* sp. y *L. monocytogenes* respectivamente, con el objetivo de evaluar la calidad sanitaria e investigar la presencia de patógenos bacterianos (*Salmonella* sp. y *Listeria* sp.) en quesos frescos de venta en mercados públicos ubicados en la zona Norte de la Ciudad de Puebla.

Los resultados de los análisis de las muestras de queso fresco reflejaron recuentos de coliformes fecales (CF) que oscilaron entre >1100 NMP/g (3.0 Log NMP/g) y <3 NMP/g (0.5 Log NMP/g). Respecto a los recuentos de hongos y levaduras (H y L) presentaron valores entre 42000 UFC/g (4.6 Log UFC/g) y <10 UFC/g (1 Log UFC/g) para el caso específico de los hongos, mientras que para las levaduras se obtuvieron valores entre 112000 UFC/g (5 Log UFC/g) y <10 UFC/g (1 Log UFC/g). Para *S. aureus* se obtuvieron valores de 160000 UFC/g (5.2 Log UFC/g) y 1400 UFC/g (3.1 Log UFC/g) en solo dos muestras, para el resto de ellas el valor fue <10 UFC/g (1 Log UFC/g).

No se recuperó ninguna cepa de *Salmonella* sp ni de *Listeria monocytogenes*. Sin embargo se logró aislar e identificar una cepa de *Listeria seeligeri*.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son uno de los principales problemas de salud pública; sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce el origen. En México, como en otros países en desarrollo, a la par con la economía del estado existe una economía informal, entre cuyas actividades se encuentra la venta de alimentos en la vía pública. Esta forma de ofrecer los alimentos a los consumidores puede ser de alto riesgo sanitario, ya que las condiciones en las que se expenden dichos productos no son apropiadas, porque favorecen la contaminación microbiológica. Los alimentos perecederos y los que requieren mucha manipulación, son los más frecuentemente involucrados, entre ellos destacan los productos lácteos y cárnicos.

Es un hecho real que, por distintos medios, los alimentos se pueden contaminar y así convertirse en transmisores de enfermedades, en detrimento de su función esencial como fuente de nutrientes para una buena salud de quienes los consumen, por lo que la detección e investigación de los brotes de Enfermedades de Trasmisión Alimentaria (ETA) constituye uno de los principales retos para el sistema de Salud Pública.

Se puede emplear el número o el tipo de microorganismos presentes en un alimento para evaluar su calidad y seguridad microbiológica, por lo cual es de gran importancia cuantificar los mohos y levaduras en los alimentos, puesto que al establecer la cuenta de estos microorganismos, permite su utilización como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada. Otro indicador utilizado es el grupo de coliformes fecales, representado principalmente por *Escherichia coli*. De la misma manera es importante tomar en consideración otros microorganismos, que son patógenos para el ser humano y que al ser ingeridos con los alimentos pueden causar serios problemas de salud, como pueden ser algunos de los pertenecientes a los géneros *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus*; por mencionar algunos.

2. MARCO TEORICO

2.1 Enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs).

Las intoxicaciones alimentarias eran reconocidas como síndromes adquiridos por la ingestión de alimentos con microorganismos infecciosos, sus toxinas o sustancias tóxicas. Sin embargo, el término resultó inapropiado a largo plazo porque cada una de estas enfermedades es el resultado de otros mecanismos además de la intoxicación, considerándose más apropiado el término enfermedad transmitida por alimentos (ETA), por tratarse de enfermedades que resultan de la ingestión de alimentos (30).

Las ETA se clasifican en: las producidas por microorganismos y sus toxinas (bacterias patógenas, protozoos, otros parásitos y virus), toxinas naturales (aflatoxinas y ciguatoxinas) e intoxicaciones por químicos (metales pesados, plaguicidas y otros) (30). Existe un evidente y constante intercambio de microorganismos en el medio ambiente, en el que se producen, transportan, comercializan y se elaboran los alimentos, lo que depende del medio del cual fue obtenido, la calidad microbiológica del alimento en su estado fresco o antes de ser tratado, las condiciones higiénicas bajo las que fue manipulado, la adecuación de las posteriores condiciones de envasado, la manipulación y el almacenamiento, los cuales constituyen factores asociados a la ocurrencia de los brotes (19).

2.2 Productos lácteos.

Los productos lácteos como la leche, la mantequilla, la nata y el queso, debido a su composición química, son susceptibles de ser alterados por microorganismos. La leche es un excelente medio de crecimiento para todos los microorganismos que habitualmente la alteran, incluidos los mohos y las levaduras. La leche cruda no pasteurizada generalmente tiene un número variable de microorganismos, que dependen del cuidado empleado en el ordeño, en la limpieza y en la manipulación de los utensilios de la leche (13). La NOM-243-SSA1-2010 establece las especificaciones sanitarias y nutrimentales que deben cumplir la leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y los derivados lácteos (29).

2.3 Queso fresco

El término latino de la palabra queso es “caseus”, la FAO lo ha definido de la siguiente manera: “Queso, es un producto fresco o madurado obtenido por drenaje (del líquido) tras la coagulación de la leche, nata, leche desnatada total o parcialmente, grasa láctea o una combinación de estos componentes”. El queso es un ingrediente habitual de la cocina mexicana, algunos de los quesos típicos mexicanos son el queso fresco o frescal, amarillo, doble crema, tipo Oaxaca, manchego, Chihuahua, panela, etc. La fabricación de queso a nivel nacional se puede dividir en dos grandes grupos. Por un lado, se encuentra la fabricación de quesos con leche pasteurizada que cumple con normas oficiales y por otro lado, la fabricación de quesos a partir de leche cruda, que sólo por este motivo no cumplen con las normas sanitarias, lo que implica un riesgo para la salud. (18).

2.4 Control microbiológico

El control sanitario en la preparación de alimentos es determinante para reducir los factores de riesgo que influyen en la transmisión de enfermedades por alimentos para proteger la salud del consumidor. Como criterios microbiológicos se pueden utilizar microorganismos indicadores de contaminación, la presencia de microorganismos patógenos específicos y/o la detección de una toxina específica producida por un patógeno. Los microorganismos indicadores que generalmente se cuantifican para determinar calidad sanitaria de alimentos son mesofílicos aerobios, mohos, levaduras, coliformes totales, coliformes fecales, entre otros (10).

Normalmente, los criterios microbiológicos se emplean para evaluar: (i) la seguridad de un alimento; (ii) la implementación de Buenas Prácticas de Fabricación; (iii) el mantenimiento de la calidad (vida útil) de ciertos productos perecederos, y (iv) la utilidad de un alimento o un ingrediente para un propósito determinado (7).

2.4.1 Mohos y levaduras

Todos los productos alimenticios son susceptibles a la alteración por mohos, los quesos que poseen mohos visibles, a veces albergan especies indeseables (la alteración conocida

como “pelo de gato” la produce la especie *Mucor racemosus* y el “azulado” *Penicillium* sp.) (4).

Los hongos y levaduras están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se pueden encontrar formando parte de la flora normal de un alimento, o como agentes contaminantes provocando el deterioro fisicoquímico de éstos; además pueden sintetizar metabolitos tóxicos termoresistentes. Los mohos y levaduras en los alimentos pueden utilizarse como un indicador de prácticas sanitarias inadecuadas durante la producción y el almacenamiento de los productos, así como el uso de materia prima inadecuada. La NOM-111-SSA1-1994, establece el método general para determinar el número de mohos y levaduras viables presentes en productos destinados al consumo humano por medio de la cuenta en placa a 25 ± 1 °C. (24).

2.4.2 Coliformes totales

Los coliformes son bacilos gramnegativos no esporulados que fermentan la lactosa en 48 horas. En conjunto, están representados por cuatro géneros de la familia *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* y *Klebsiella*. De los cuales *E. coli* es más indicativo de contaminación fecal que los otros géneros indicados, con frecuencia es deseable determinar su incidencia en una población de coliformes. (13).

2.4.2.1 Coliformes fecales.

E. coli es el microorganismo marcador de elección en la comprobación o vigilancia de los alimentos y de los platos preparados tratados mediante calor a los que les han sido añadidos condimentos de última hora, no tratados por el calor. Estos incluyen el queso rallado, el salami o las hortalizas frescas, que podrían haber aportado a estos productos cantidades insignificantes de *Enterobacteriaceae* totalmente inofensivas. (16). En los productos lácteos, las pruebas de coliformes no están ideadas para indicar la contaminación fecal, pero reflejan la higiene general del establo lechero y de la planta industrial. (13). La NOM-112-SSA1-1994, establece el método microbiológico para estimar el número de coliformes fecales presentes en productos alimenticios, por medio del cálculo del número más probable (NMP) después de la incubación a 35 °C. (25).

2.4.3 *Staphylococcus aureus*

Los estafilococos han sido clasificados en la familia *Micrococcaceae* que incluye los géneros *Micrococcus*, *Staphylococcus* y *Planococcus* (7). *S. aureus* es un coco grampositivo que se presenta en parejas, cadenas cortas o agrupadas como “racimos de uvas” (11); sus células tienen un diámetro que varía, aproximadamente, desde 0.5 hasta 1.5 μm . Son organismos organótrofos, catalasa positivos (7). Es productor de seis enterotoxinas (A, B, C₁, C₂, D y E) que se diferencian en cuanto a su toxicidad; la mayoría de las intoxicaciones alimentarias por toxina estafilocócica son producidas por la toxina de tipo A.

Si bien *S. aureus* es una especie mesófila, algunas de sus cepas son capaces de crecer a una temperatura tan baja como es la de 6.7 °C; en general, esta especie crece dentro de la escala de temperaturas comprendida entre 7 °C y 48 °C mientras que las enterotoxinas son producidas entre 10 °C y 46 °C, estando su temperatura óptima, para dicha producción, comprendida entre 40 °C y 45 °C. *S. aureus* es capaz de crecer en concentraciones de sal comprendidas entre el 7 % y el 10 %; tiene también un elevado grado de tolerancia a compuestos tales como el telurito, el cloruro mercuríco, la neomicina, la polimixina, entre otros. Con respecto al pH, es capaz de crecer dentro de la escala comprendida entre los valores 4.0 y 9.8, aunque su pH óptimo de crecimiento está en la escala comprendida entre 6 y 7. (13).

Se encuentran estafilococos en el aire, polvo, aguas residuales, leche y otros alimentos, equipos de las fábricas de alimentos, superficies del entorno, personas y animales. Los reservorios primarios son la especie humana y los animales. La intoxicación humana se debe a la ingestión de enterotoxinas elaboradas en los alimentos por algunas cepas de *S. aureus*, normalmente porque los alimentos no se han conservado a temperaturas suficientemente altas o suficientemente frías (11).

Una propiedad importante de las enterotoxinas es su termoestabilidad, en general, ni los tratamientos de pasteurización (72 °C durante 15 segundos) ni el calentamiento a temperaturas muy elevadas (143 °C durante 9 segundos) serían suficientes para inactivar las enterotoxinas. Entre los alimentos implicados como causantes de intoxicaciones alimentarias se incluyen carnes y productos cárnicos, el pescado y sus derivados, la leche y los productos lácteos, ensaladas, budines, empanadas, etc. (12).

La intoxicación por *S. aureus* generalmente se define como una enfermedad autolimitante que se presenta con emesis después de un periodo de incubación corto. Sin embargo, el vómito no es el único síntoma que se observa habitualmente; otros síntomas frecuentes incluyen náuseas, retortijones abdominales, dolores de cabeza, vértigo, escalofríos, sudoración y/o abatimiento. En este tipo de intoxicación puede presentarse diarrea acuosa con o sin sangre (7). Se estima que un alimento es de riesgo en la intoxicación alimentaria por *S. aureus*, cuando se confirma la presencia de alguna de sus enterotoxinas o tiene una carga del microorganismo igual o superior a 10^5 UFC/g (6). La NOM-115-SSA1-1994, establece el método microbiológico para determinar la cuenta de *S. aureus* presente en alimentos. (27).

2.5 *Salmonella* sp.

Salmonella es un bacilo gramnegativo, aerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, cuyo tamaño oscila entre 0.3-1 μm x 1-6 μm , son móviles por flagelos peritricos o inmóviles, no forman endosporas. Quimiorganótrofos, poseen un metabolismo oxidativo y fermentativo. Producen ácido y, a menudo, gas durante la fermentación de la D-glucosa o de otros hidratos de carbono, catalasa positivos (salvo raras excepciones), oxidasa negativos. La tabla 1 presenta otras características bioquímicas del género *Salmonella*.

Tabla 1. Caracteres bioquímicos de *Salmonella* sp.

Prueba	Resultado
Reducción de nitratos a nitritos	+
Fermentación de azúcares	+
Citrato	+
Producción de gas a partir de glucosa	+
Producción de SH ₂	+
Utilización de lactosa	-
Utilización de sacarosa	-

Posesión de β -Galactosidasa	-
Posesión de Ureasa	-
Posesión de Lisina Descarboxilasa	-
Posesión de Arginina Deshidrolasa	-/+
Fermentación de manitol	+
Producción de Indol	-
Reacción de Voges-Proskauer	-
Oxidasa	-
Catalasa	+

Fuente: Adaptada de Bourgeois y col., 1994.

La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 35 °C y 37 °C; sin embargo, *Salmonella* puede multiplicarse desde 5 °C a 45-47 °C, aunque a temperaturas inferiores de 10 °C el crecimiento sufre un retraso considerable. Las temperaturas de refrigeración permiten la supervivencia de *Salmonella*, en tanto que la congelación provoca un descenso considerable del número de bacterias, aunque nunca su completa desaparición. Soportan un rango de pH entre 4.5 y 9 con óptimo de 6.5 a 7.5.

Salmonella es bastante sensible al NaCl, sin embargo, la concentración máxima tolerada es de 5.8 %. El género *Salmonella* puede diferenciarse en serotipos en función de las estructuras antigénicas de sus cepas. Se distinguen (4):

- * Antígenos somáticos (antígenos O).
- * Antígenos de la cubierta (antígenos capsulares = antígenos K).
- * Antígenos flagelares (antígenos H)

Las personas y los animales son directa o indirectamente la fuente de contaminación de los alimentos con *Salmonella*. Los microorganismos pueden proceder de enfermos clínicos o de portadores. También pueden proceder de los gatos, perros, cerdos, y bovinos, aunque las fuentes más importantes de *Salmonella* de los alimentos son las aves y sus huevos y los roedores (12).

De los diversos sectores en la industria cárnica, los productos avícolas siguen siendo los reservorios principales de *Salmonella* en muchos países, superando a otros productos cárnicos como la carne de cerdo, la carne de vaca y la carne de carnero como posibles vehículos de infección. La persistencia de *Salmonella* en las industrias de carne porcina, bovina y ovina tiene su origen tanto en la exposición del ganado a fuentes de contaminación ambientales y a piensos contaminados como en la transmisión paterna de la infección (7).

Las infecciones humanas con *Salmonella* pueden producir varias enfermedades clínicas, que incluyen la fiebre entérica (tifoidea), enterocolitis no complicadas, e infecciones sistémicas por microorganismos no tifoideos. Las manifestaciones clínicas de la fiebre entérica aparecen después de un periodo de incubación que varía desde 7 a 28 días y puede incluir diarrea, fiebre prolongada y ondulante, dolor abdominal, dolor de cabeza y abatimiento. Por lo general, las infecciones humanas con *Salmonella* no tifoideas acaban en una enterocolitis que aparece de 8 a 72 horas después del contacto con el patógeno invasor, es generalmente autolimitante y la remisión de las deposiciones diarreicas no sanguinolentas y del dolor abdominal suele ocurrir transcurridos cinco días desde el comienzo de los síntomas (7).

En la producción de los brotes de infecciones por *Salmonella* se hallan implicados un gran número de alimentos distintos como la carne de aves y los productos derivados de la misma. La leche y los productos lácteos, incluso la leche fresca, las leches fermentadas, los helados, y el queso, han producido infecciones salmonelósicas (12). La NOM-114-SSA1-1994, establece un método para la determinación de *Salmonella* en alimentos, la cual describe un esquema general que consta de 5 pasos básicos: pre-enriquecimiento, enriquecimiento selectivo, selección en medios sólidos, identificación bioquímica y serotipificación. (26).

2.6 *Listeria* sp.

Listeria ha sido aislada de diferentes sitios ambientales, como: suelo, agua, efluentes, de una gran variedad de alimentos y de heces humanas y animales. El habitat natural de estos microorganismos es probablemente la materia orgánica vegetal en descomposición y los rumiantes domésticos contribuyen al mantenimiento de *Listeria* sp. en el ambiente

rural a través de un ciclo continuo de enriquecimiento oral-fecal. El género *Listeria* comprende seis especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*. Las listerias forman parte del grupo de bacterias de afiliación incierta. Están próximas a la familia *Lactobacillaceae* y pertenecen a la misma sección que el género *Erysipelothrix* (4). El género *Listeria* está compuesto por bacterias grampositivas, estrechamente relacionadas con los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Staphylococcus*. (5). Crecen entre 0 °C y 42 °C; son más resistentes, al calor que *Salmonella* y se destruyen por pasteurización. La especie que más preocupa por lo que concierne a las toxiinfecciones alimentarias es *L. monocytogenes* (11).

L. monocytogenes es un bacilo corto, grampositivo, dotado de movilidad, capaz de crecer a 4 °C (12), puede agruparse en empalizada, a veces cocobacilar, no es ácido-alcohol resistente, catalasa positivo, oxidasa negativo. Es una bacteria aerobia facultativa que se desarrolla mejor en presencia de una tensión reducida de oxígeno. Su pH óptimo de crecimiento está próximo a la neutralidad (7.2-7.6). El pH límite esta alrededor de 5.6. En cuanto a las temperaturas esta bacteria puede proliferar entre 3 °C y 45 °C (temperatura óptima 30 °C - 37 °C). A 4 °C se multiplica mejor que otras bacterias presentes en los quesos (4). Las tablas 2 y 3 muestran algunos parámetros de identificación de *Listeria*.

Tabla 2. Diferenciación de géneros relacionados con *Listeria*.

	<i>Listeria</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Erysipelothrix</i>	<i>Enterococcus</i>
Microscopia	cocobacilar	bacilar	bacilar	cocos
Catalasa	+	-	-	-
Vancomicina	S	R	R	S/R
Movilidad	+	-	-	-/+
Producción de SH ₂	-	-	+	-
Bilis esculina	+	-	-	+
NaCl 6.5 %	+	-	-	+
B-hemólisis	V	-	-	V

Fuente: Callejo y col., 2008.

Tabla 3. Diferenciación fenotípica de especies del género *Listeria*.

Características	<i>L. grayi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. ivanovii</i> subesp. <i>londoniensis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>
B-hemolisis	-	-	++	++	+	+	-
Prueba de CAMP							
<i>S.aureus</i>	-	-	-	-	+	+	-
<i>R.equi</i>	-	-	+	+	-/+	-	-
Fermentación de:							
Manitol	+	-	-	-	-	-	-
L-ramnosa	V	V	-	-	+	-	V
D-xilosa	-	-	+	+	-	+	+
Hidrólisis de hipurato	-	+	+	+	+	No determinado	No determinado
Reducción de nitratos	-	-	-	-	-	No determinado	No determinado
Serotipo	Específico	4ab 6a 6b	5	5	1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7	1/2a, 1/2b, 1/2c, 4b, 4d, 6b	1/2b, 4c, 6a, 6b
Patogenicidad murina	-	-	+	?	+	-	-
Ecología	No patógeno	No patógeno	Suelo, alimento, heces. Patógeno animal		Suelo, alimento, heces. Patógeno humano y animal	No patógeno	No patógeno

Fuente: Callejo y col., 2008.

Considerando los antígenos somático (O) y flagelar (H), las cepas de *L. monocytogenes* pueden ser clasificadas en 13 serotipos; sin embargo, se ha determinado que solo 3 (1/2a, 1/2b y 4b), son responsables de más de 98 % de los casos de listeriosis en humanos (31).

2.6.1 Características de la enfermedad.

L. monocytogenes es responsable de infecciones oportunistas que afectan

preferentemente a individuos cuyo sistema inmune es débil, como mujeres gestantes, recién nacidos y ancianos. (11). La enfermedad se manifiesta como una meningoencefalitis aunque también puede producir un cuadro de septicemia. Puede iniciar de forma repentina, con dolor intenso de cabeza, fiebre, náuseas, vómito e irritación de las meninges. El periodo de incubación es de tres semanas (8).

Dentro de las formas clínicas de la enfermedad, la listeriosis gastrointestinal no invasiva es la forma más habitual. Aparentemente es una causa infrecuente de diarrea febril esporádica. Aproximadamente 24 horas después de la ingesta del alimento contaminado los pacientes o bien se convierten en pacientes asintomáticos o sufren deposiciones acuosas, náuseas, vómitos, cefalea, artromialgias y fiebre, síntomas que suelen limitarse en dos días, salvo que padezcan algún tipo de inmunodepresión.

Otra forma clínica es la listeriosis invasiva que puede desencadenar en (22):

- Enfermedad gestacional y neonatal. La gravedad radica en que –sobre todo en el tercer trimestre- suele presentarse aborto, muerte fetal intrauterina, mayor tasa de cesáreas, prematuridad, sepsis y muerte neonatal.
- Bacteriemia. La forma clínica más frecuente en inmunodeprimidos.
- Infección del sistema nervioso central. Los pacientes pueden tener meningitis, meningoencefalitis o cerebritis.
- Endocarditis. Es una rara y grave complicación de la bacteriemia.

2.6.2 Patogenia.

El motivo por el que *L. monocytogenes* produce una grave infección, se debe a la capacidad que tiene de inducir su propia fagocitosis por células fagocíticas y no fagocíticas del huésped, seguido por la replicación en el interior de las mismas y su transferencia directa a otra célula. Como *L. monocytogenes* es un microorganismo intracelular, se disemina protegido de las defensas del huésped incluyendo anticuerpos y complemento. Una intrincada serie de factores de virulencia son producidos por *L. monocytogenes* para facilitar cada paso en su proceso de invasión. Varios de estos factores han sido identificados (5).

- a) Internalina (InIA) e InIB y/o otros factores de internalización.
- b) Listeriolisina O (LLO) y las fosfolipasa C fosfatidil inositol específica (PI-PLC).

- c) Transportador de fosfato hexosa bacteriano (Hpt) y una ligasa protein lipoato (LpLA1).
- d) Filamentos de actina (ActA).
- e) Fosfolipasa C fosfatidilcolina específica (PC-PLC).

2.6.3 Transmisión.

El principal alimento responsable de la transmisión de la listeriosis al hombre ha sido la leche cruda. La contaminación de los productos lácteos es heterogénea, accidental y poco intensa (4). Se ha determinado que *L. monocytogenes* ingresa a través de la vestimenta, el calzado, las manos de los operarios, como también con los utensilios, el equipamiento y los materiales utilizados. Dada la dificultad para impedir su ingreso a los lugares de procesamiento, es necesario tomar medidas rigurosas para su eliminación durante los procesos de limpieza e higienización y conocer los parámetros que limitan su desarrollo.

L. monocytogenes forma biopelículas o “biofilm” en superficies donde han quedado residuos orgánicos lo cual dificulta la acción de los higienizantes. (23).

2.6.4 Identificación.

La NOM-143-SSA1-1995, establece el método para detectar la presencia de *L. monocytogenes*. (28).

3. MARCO DE REFERENCIA

- Félix y col. en el año 2005 realizaron una investigación de la calidad sanitaria de diversos alimentos disponibles al público en Ciudad Obregón, Sonora, México; los parámetros microbiológicos investigados fueron: mesofílicos aerobios, coliformes totales, coliformes fecales, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*. Las determinaciones microbiológicas se llevaron a cabo utilizando los métodos oficiales establecidos por la Secretaría de Salud. Los resultados para queso fresco fueron: 3 de las muestras (n=35) presentaron valores dentro de norma para coliformes fecales, con rangos de 500 a 1100 NMP/g de alimento; para *Salmonella* sp. ninguna muestra tuvo presencia de este microorganismo (9).
- Martino y col. en el año 2005 determinaron la incidencia de *Listeria* en 54 muestras de quesos y 98 de embutidos y ahumados, comercializados en Cuba. Se llevo a cabo un método convencional para la detección cuantitativa y cualitativa de *Listeria monocytogenes* según la norma UNE-EN ISO 11290, además se realizaron pruebas bioquímicas adicionales para la identificación de otras cepas de *Listeria*. Para la detección cuantitativa se aplicó una prueba de diagnóstico rápido. *Listeria monocytogenes* se aisló en queso azul, salchichón y mortadela; *Listeria innocua* en queso frescal, queso cubanita, chorizo, longaniza magro y morcilla y *Listeria welshimeri* en salchichas (14).
- Albarracin y col. en el año 2006 realizaron una estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp. en quesos frescos y queso doble crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. La técnica utilizada para el aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* fue la descrita por INVIMA en 1998 y para el aislamiento e identificación de *Salmonella* sp. la técnica convencional. Con relación a los patógenos analizados, se lograron aislar 31 cepas correspondientes al género *Listeria* distribuidas así: 11 de *Listeria monocytogenes* y 20 de otras especies. Para el caso de *Salmonella* sp. no se encontró evidencia de ella en los productos analizados, lo cual no significa su ausencia en ellos, sino que factores como el pH ácido de los quesos, la baja disponibilidad de azúcares

para su desarrollo y tensiones de oxígeno bajas en el queso pueden enmascarar la presencia de este microorganismo (1).

➤ Alcázar y col. en el año 2006 realizaron un estudio para la detección de *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se venden en algunos “mercados sobre ruedas” en la ciudad de México mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como con los métodos convencionales según la normativa correspondiente para cada microorganismo. Se analizaron 120 muestras seleccionadas al azar; del total de muestras analizadas con la técnica de PCR, solo tres resultaron positivas a *Salmonella* sp., en ninguna estuvo presente *L. monocytogenes*, en contraste con los resultados de los métodos bacteriológicos, por medio de los cuales no se obtuvo ningún resultado positivo (2).

➤ Baquero y col. en el año 2006 evaluaron la presencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos artesanales comercializados en la plaza de mercado de Cáqueza, Cundinamarca. Se analizaron 30 quesos utilizando el método horizontal para el aislamiento de *L. monocytogenes*; enriquecimiento selectivo primario, aislamiento selectivo, purificación e identificación. Según los datos obtenidos el 80 % de las muestras positivas para *Listeria* sp. presentaron *L. monocytogenes* y el 20 % *L. innocua*. De la misma forma, se determinó que el 100 % de los quesos presentaban alguna contaminación microbiana (3).

➤ Quintero en el año 2009 evaluó la calidad sanitaria en quesos frescos artesanales que se consumen en la Ciudad de México. Analizó 30 muestras, de las cuales en el 61.5 % *E. coli* estuvo presente y *S. aureus* se aisló en el 77 % de los casos según la técnica rápida de las placas Petrifilm 3M®. Posteriormente se hizo la recuperación de cepas para su identificación bioquímica con el sistema API; ninguna de las cepas ensayadas resultó ser *E. coli* y únicamente el 7.14 % resultó ser *S. aureus* (20).

➤ Marrufo en 2011 analizó la calidad sanitaria de queso tipo panela a nivel mercado sobre ruedas y tianguis en el Estado de México. Se analizaron 30 quesos; 24 (83 %) de ellos fueron positivos para coliformes fecales por la técnica del número más probable de las cuales 23 (76 %) se encontraron fuera de la especificación. 29 (97 %) muestras tuvieron presencia de *S. aureus* aunque solo 8 (26.67 %) presentaron valores fuera de la norma. 21 (70 %) muestras presentaron mohos y levaduras, de las cuales solo 2 (6.67 %)

estuvieron fuera de la norma. Hubo ausencia de *Salmonella* en el 100 % de las muestras (15).

➤ Muñoz y col. en el año 2011 llevaron a cabo un estudio para evaluar la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y *delicatessen* de supermercados de cadena en Bogotá, D.C; donde se analizaron 600 alimentos. Se utilizaron metodologías de referencia de presencia o ausencia de *L. monocytogenes* en 25 g o mL de alimento. De las 600 muestras analizadas, 68 fueron positivas para *L. monocytogenes*, 26 procedieron de *delicatessen*, 42 de plazas de mercado. Los quesos frescos y los quesos madurados mostraron mayor contaminación de *L. monocytogenes* que el resto de alimentos del estudio (17).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que no existen reportes que alerten a la sociedad sobre el consumo de queso fresco y su importancia en las enfermedades de transmisión alimentaria (ETAs), se planteó realizar un estudio para evaluar la calidad microbiológica de uno de los alimentos que se consume con gran frecuencia dentro de la dieta diaria, el queso. Ya que este tipo de alimento es producido en la mayoría de los casos por pequeños empresarios, donde las condiciones de elaboración, conservación, traslado y distribución suelen ser muy diferentes unas de otras, y en muy pocas ocasiones se apegan a la normativa vigente aprobada por las autoridades sanitarias.

Por esta razón es preciso analizar y evaluar la presencia de ciertos microorganismos que pueden resultar patógenos para el hombre como *Salmonella* sp. y *Listeria* sp.; del mismo modo, se incluyó en el trabajo indicadores de buenas prácticas higiénicas en la producción de alimentos, así como de la calidad de la materia prima utilizada en dicho proceso.

5. JUSTIFICACIÓN

En México no existen registros en cuanto a la notificación de casos de enfermedades gastrointestinales y su relación con el consumo de alimentos que se expenden en la vía pública. Los quesos frescos elaborados a partir de leche que no son sometidos a tratamientos rigurosos como la pasteurización antes de ser consumidos, constituyen una fuente potencial de transmisión de patógenos causantes de enfermedades como Salmonelosis, Listeriosis, enfermedades entéricas y en general enfermedades que se caracterizan por fiebre, diarrea y vómito.

Salmonella sp. es una de las bacterias de mayor importancia en quesos ya que llega a estos alimentos por contaminación a partir de las manos del ordeñador, por heces de los animales, por contaminación del equipo de ordeño, por aguas contaminadas o por una deficiente cocción en la materia prima. Diversos estudios han demostrado la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos siendo este un microorganismo emergente que ha cobrado especial importancia en los últimos años debido a su tasa de mortalidad (aproximadamente 30 %).

Basado en el hecho de que actualmente algunos de los alimentos que se consumen son elaborados en condiciones poco higiénicas a pesar del existente control por parte de la autoridad sanitaria, se realizó el estudio del queso, cuya elaboración tiene una excesiva variabilidad en cuanto a las condiciones de fabricación, el origen de la materia prima, el proceso mismo, su conservación y distribución; siendo todas estas variables condicionantes para la calidad alimentaria del producto; por lo que surge el interés de conocer la presencia de *Salmonella* sp. y *Listeria* sp. particularmente en quesos frescos de venta en mercados públicos ubicados en la zona Norte de la Ciudad de Puebla.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la calidad sanitaria e investigar la presencia de patógenos bacterianos (*Salmonella* sp. y *Listeria* sp.) en quesos frescos de venta en mercados públicos ubicados en la zona Norte de la Ciudad de Puebla (Mercado Ignacio Zaragoza, Mercado Miguel Hidalgo y Costilla, Mercado Municipal La Acocota, Mercado José María Morelos y Pavón).

6.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Realizar recuento de mohos y levaduras, de acuerdo con la NOM-111-SSA1-1994.
- Realizar recuento de bacterias coliformes fecales, de acuerdo con la NOM-112-SSA1-1994.
- Realizar recuento de *Staphylococcus aureus*, de acuerdo con la NOM-115-SSA1-1994.
- Aislar e identificar *Salmonella* sp., de acuerdo con la NOM-114-SSA1-1994.
- Aislar e identificar *Listeria* sp., de acuerdo con la NOM-143-SSA1-1995.

7. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

7.1. Tipo de estudio

Prospectivo, observacional, transversal y descriptivo.

7.2. Universo del estudio

Quesos frescos elaborados a partir de leche de vaca

7.3. Tamaño de la muestra

El tamaño de la muestra fue de 40 piezas de queso fresco (diez muestras por mercado) recolectadas aleatoriamente en 4 mercados de la zona norte de la Ciudad de Puebla (Mercado Ignacio Zaragoza, Mercado Miguel Hidalgo, Mercado Municipal la Acocota, Mercado José María Morelos y Pavón).

7.4. Toma de muestra

Las muestras se obtuvieron haciendo una compra cotidiana aleatoria del producto, que fue entregado en las bolsas comúnmente utilizadas para su venta, y fueron transportadas al laboratorio bajo las condiciones adecuadas de refrigeración. El periodo de muestreo abarcó del 15 de junio al 10 de julio de 2015.

7.5. Sede y lugar de estudio

Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Microbiología ubicado en el edificio 105A perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

7.6. Criterios de inclusión:

- Queso fresco hecho a base de leche de vaca.
- Queso fresco de venta en los mercados públicos señalados.
- Queso fresco de venta a granel.

7.7. Criterios de exclusión:

- Queso fresco hecho a base de leche diferente a la de vaca.
- Queso fresco de venta en expendios establecidos fuera de los mercados públicos antes señalados.
- Queso fresco empacado previamente para su venta.
- Queso fresco obtenido en domicilios particulares.

7.8. Criterios de eliminación:

- Quesos frescos contaminados por factores externos durante el transporte.

7.9. Recursos humanos

Director de tesis: M.S.P. Carlos Cabrera Maldonado

Asesor de tesis: M.C Gloria León Tello

Tesistas: María Jaqueline García García y Mariana Velázquez García

7.10. Recursos financieros

Esta investigación fue financiada por el Cuerpo Académico Microbiología 038, de la Facultad de Ciencias Químicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; y forma parte del proyecto “Investigación de patógenos bacterianos en diversos alimentos que se consumen en la ciudad de Puebla de venta en mercados públicos.”, aprobado por la Dirección General de Planeación Institucional - BUAP.

7.11. Análisis estadístico de la información:

Se utilizó una estadística descriptiva mediante tablas y gráficas para representar los resultados.

8. MATERIALES Y METODOLOGÍA

8.1. Recursos materiales:

Todo el material, equipo, medios de cultivo y reactivos del laboratorio de Microbiología Sanitaria.

Cepas:

- ATCC 25923 de *S. aureus*, donada por el Dr. Rigoberto Hernández Castro del Hospital Gral. González, México, D.F.
- ATCC 14028 de *Salmonella typhi*, donada por el Dr. Rigoberto Hernández Castro del Hospital Gral. González, México, D.F.
- Cepa de *Listeria* sp., recuperada de un paciente y donada por el Hospital del Niño Morelense.

8.2. Metodología:

Para la realización de este trabajo se siguió el diagrama No.1

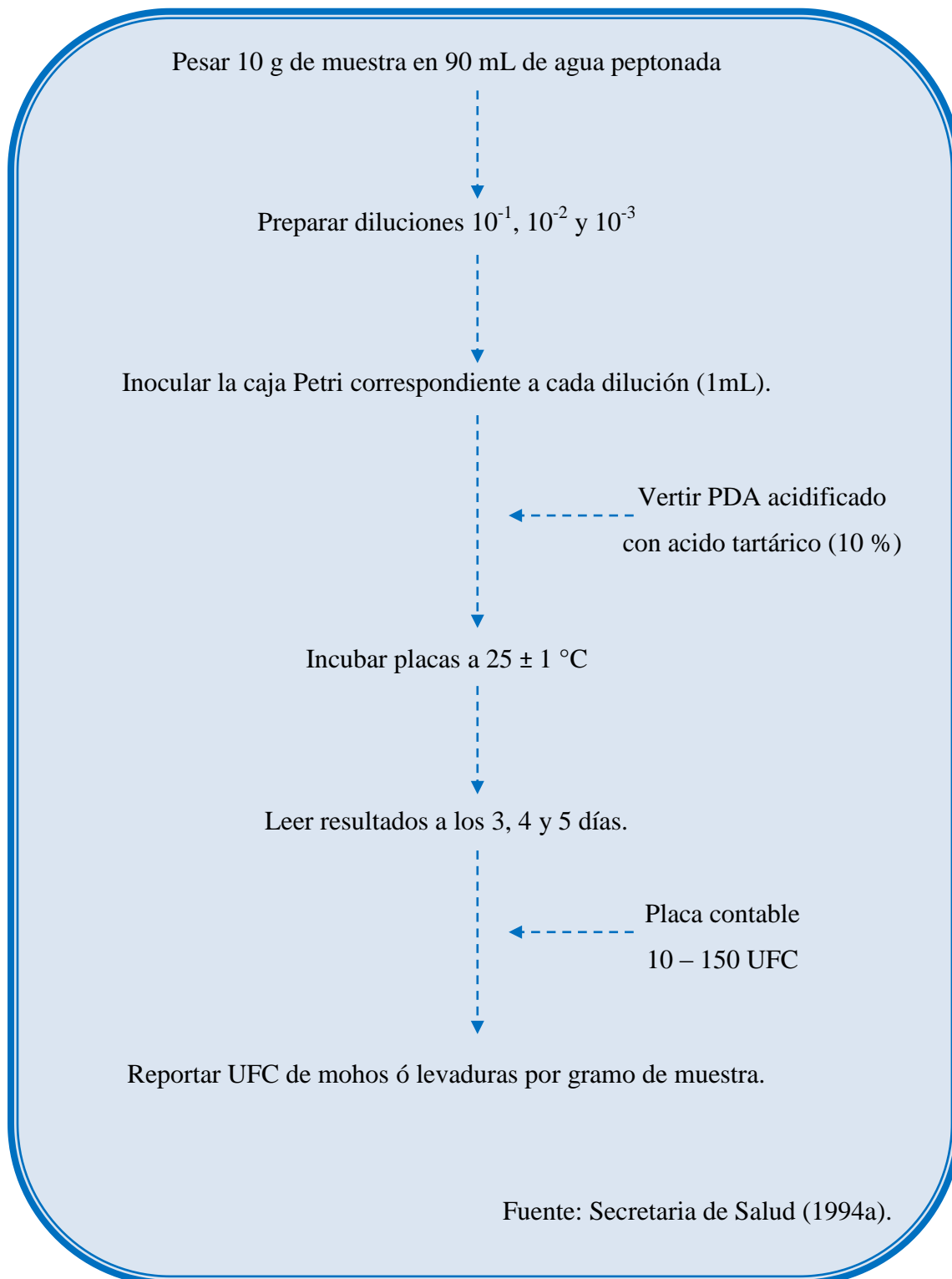
DIAGRAMA No.1 ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



Fuente: Diseño del estudio.

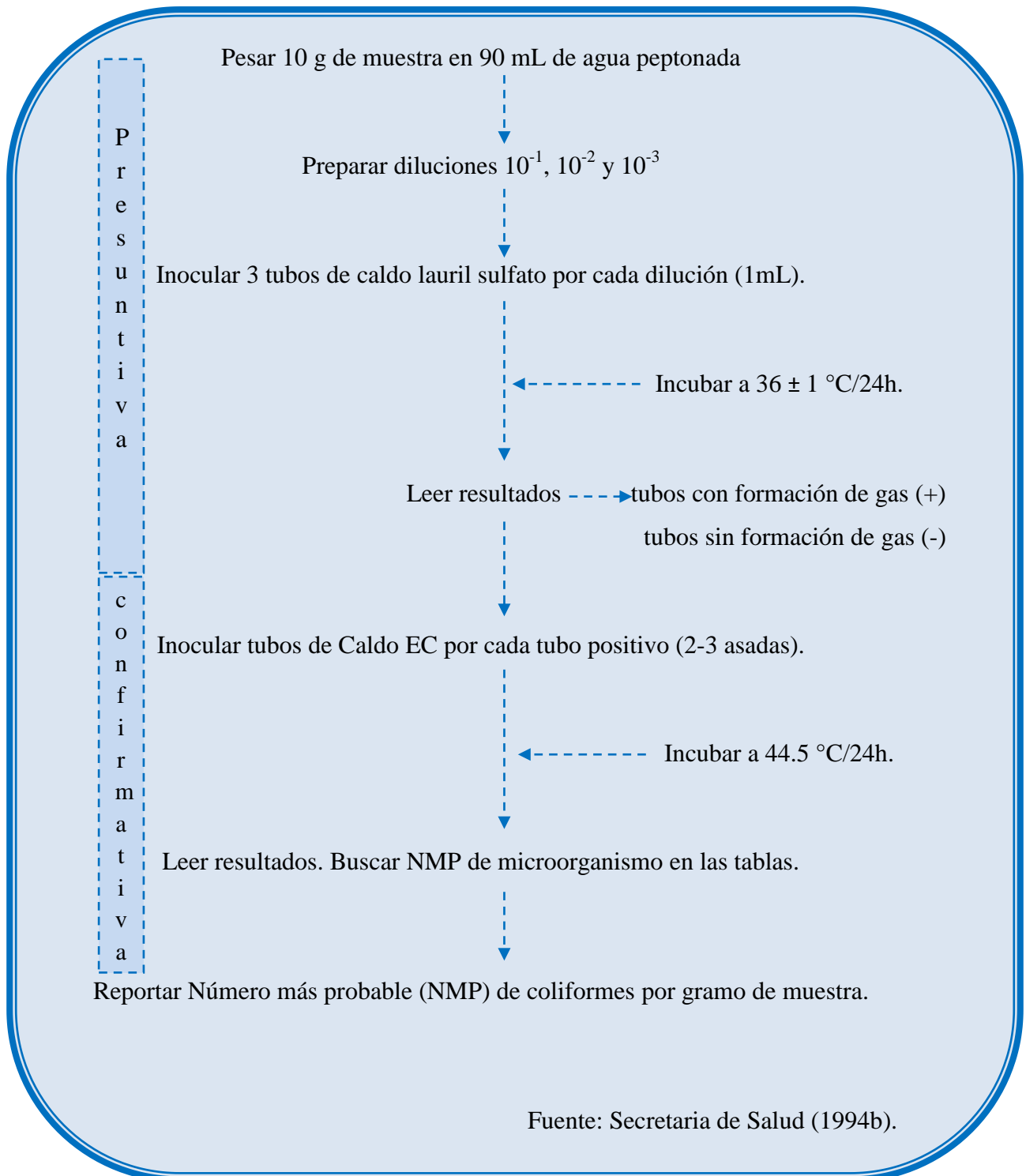
Para la realización del recuento de mohos y levaduras, se llevó a cabo el diagrama No.2

DIAGRAMA No.2 RECUENTO DE MOHOS Y LEVADURAS EN ALIMENTOS.



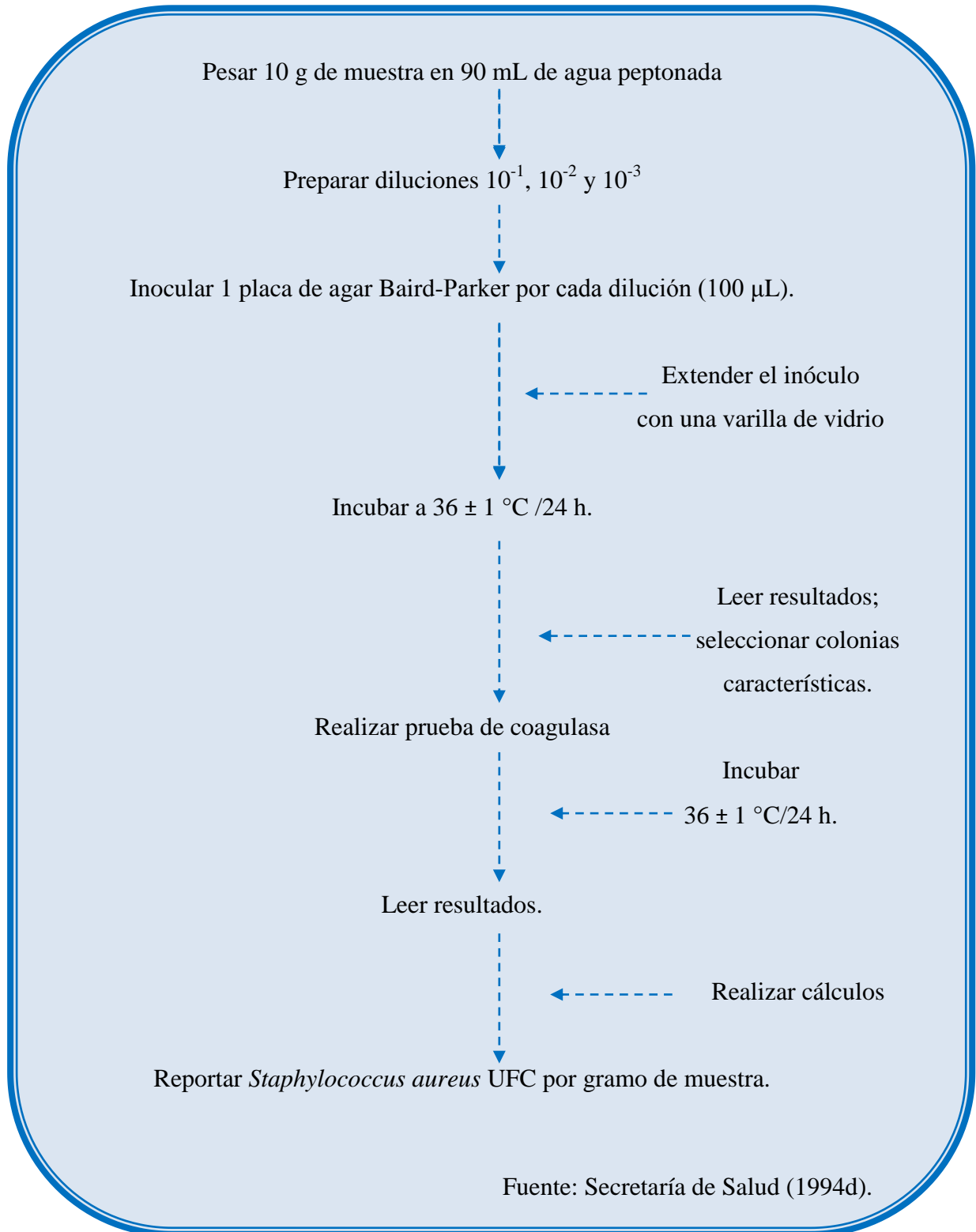
Para la determinación de coliformes fecales, se llevó a cabo el diagrama No.3

DIAGRAMA No.3 DETERMINACION DE COLIFORMES FECALES POR LA TÉCNICA DEL NÚMERO MÁS PROBABLE.



Para el recuento de *Staphylococcus aureus*, se llevó a cabo el diagrama No.4

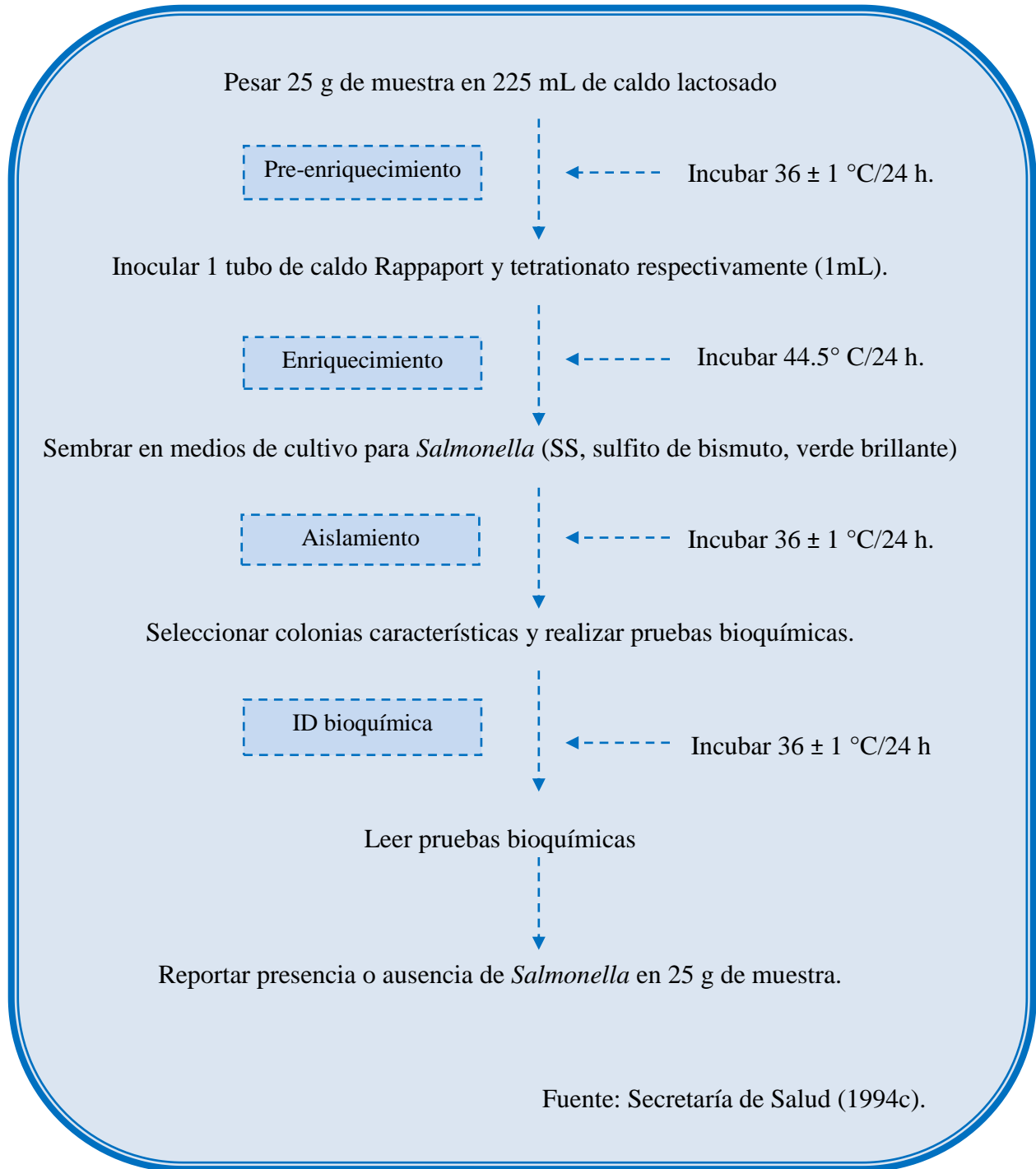
DIAGRAMA No.4 RECuento DE *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Secretaría de Salud (1994d).

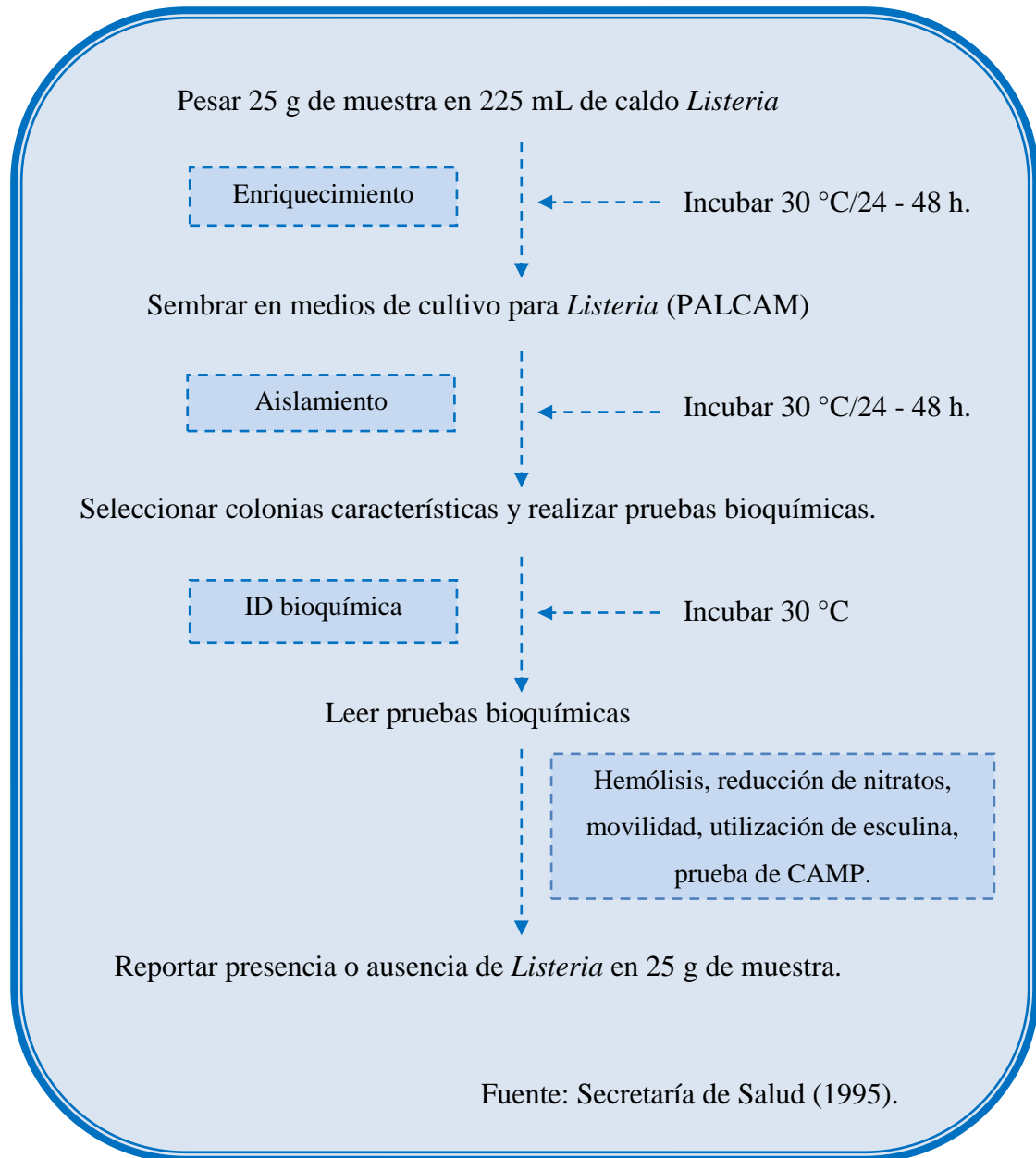
Para la investigación de *Salmonella* sp. se llevó a cabo el diagrama No.5

DIAGRAMA No.5 INVESTIGACIÓN DE *Salmonella* sp.



Para la investigación de *Listeria* sp. se llevó a cabo el diagrama No.6

DIAGRAMA No.6 INVESTIGACIÓN DE *Listeria* sp.



9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Se recolectaron 40 muestras de queso fresco obtenidas en mercados públicos ubicados en la zona Norte de la ciudad de Puebla, mediante un muestreo no probabilístico por selección intencional durante los meses de Junio y Julio del año 2015. La Tabla No. 4 muestra los resultados obtenidos para cada grupo de microorganismos.

Tabla No. 4. Resultados de los análisis microbiológicos realizados a quesos frescos provenientes de mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla.

No. de muestra	CF (NMP/g)	Mohos (UFC/g)	Levaduras (UFC/g)	<i>S. aureus</i> (UFC/g)
1	>1100	60	20	10
2	>1100	20000	1500	10
3	>1100	160	10	10
4	>1100	700	50	1400
5	>1100	8500	70	10
6	>1100	14000	10	10
7	>1100	2000	112000	160000
8	11	10	10	10
9	>1100	320	10	10
10	<3	950	220	10
11	>1100	1360	300	10
12	240	500	10	10
13	11	800	10	10
14	>1100	1420	650	10
15	<3	260	10	10
16	4	650	10	10
17	1100	660	10	10
18	>1100	10	10	10
19	240	280	10	10
20	1100	142	10	10
21	>1100	210	10	10
22	150	150	10	10
23	93	570	10	10
24	11	10	10	10
25	14	10	10	10
26	>1100	10	10	10
27	460	200	10	10
28	>1100	980	150	10
29	>1100	400	10	10
30	>1100	10	10	10
31	>1100	10	10	10
32	>1100	42000	7300	10
33	<3	10	10	10
34	>1100	12400	400	10
35	1100	150	10	10
36	<3	300	10	10

37	7	6000	1500	10
38	>1100	10	10	10
39	>1100	240	10	10
40	<3	4000	150	10

Fuente: Resultados de laboratorio

La Tabla No.5 muestra los resultados obtenidos expresados logarítmicamente (Log_{10}) para facilitar su representación gráfica y la visualización de los mismos.

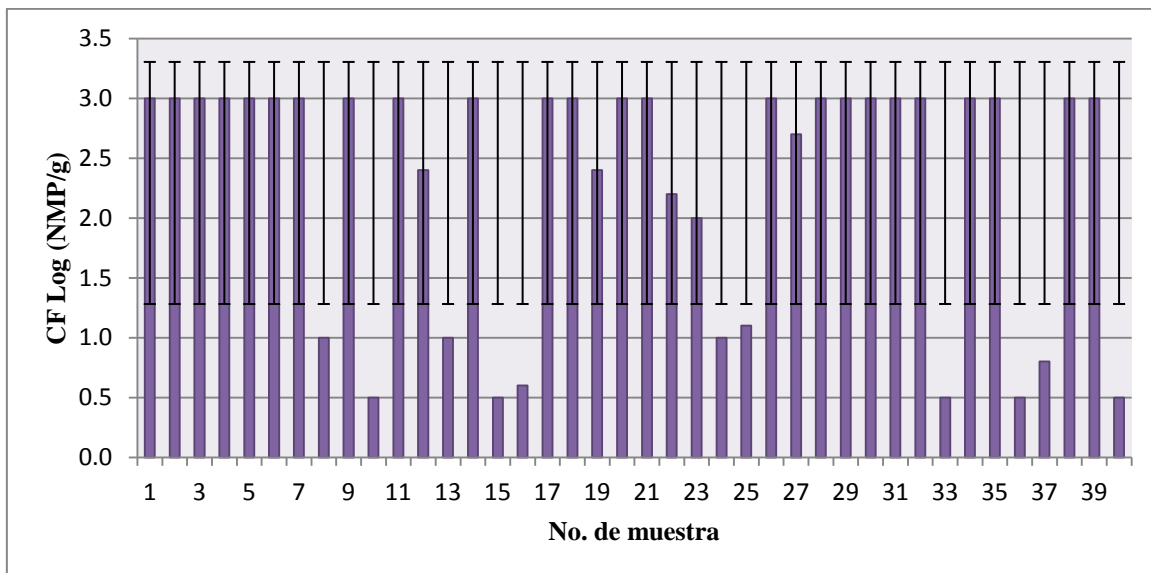
Tabla No. 5 Expresión logarítmica de los resultados de los análisis microbiológicos realizados a quesos frescos provenientes de mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla.

No. de muestra	CF Log (NMP/g)	Mohos Log (UFC/g)	Levaduras Log (UFC/g)	<i>S. aureus</i> Log(UFC/g)
1	3.0	1.8	1.3	1.0
2	3.0	4.3	3.2	1.0
3	3.0	2.2	1.0	1.0
4	3.0	2.8	1.7	3.1
5	3.0	3.9	1.8	1.0
6	3.0	4.1	1.0	1.0
7	3.0	3.3	5.0	5.2
8	1.0	1.0	1.0	1.0
9	3.0	2.5	1.0	1.0
10	0.5	3.0	2.3	1.0
11	3.0	3.1	2.5	1.0
12	2.4	2.7	1.0	1.0
13	1.0	2.9	1.0	1.0
14	3.0	3.2	2.8	1.0
15	0.5	2.4	1.0	1.0
16	0.6	2.8	1.0	1.0
17	3.0	2.8	1.0	1.0
18	3.0	1.0	1.0	1.0
19	2.4	2.4	1.0	1.0
20	3.0	2.2	1.0	1.0
21	3.0	2.3	1.0	1.0
22	2.2	2.2	1.0	1.0
23	2.0	2.8	1.0	1.0
24	1.0	1.0	1.0	1.0
25	1.1	1.0	1.0	1.0
26	3.0	1.0	1.0	1.0
27	2.7	2.3	1.0	1.0
28	3.0	3.0	2.2	1.0
29	3.0	2.6	1.0	1.0
30	3.0	1.0	1.0	1.0
31	3.0	1.0	1.0	1.0
32	3.0	4.6	3.9	1.0
33	0.5	1.0	1.0	1.0
34	3.0	4.1	2.6	1.0
35	3.0	2.2	1.0	1.0
36	0.5	2.5	1.0	1.0

37	0.8	3.8	3.2	1.0
38	3.0	1.0	1.0	1.0
39	3.0	2.4	1.0	1.0
40	0.5	3.6	2.2	1.0

Fuente: Resultados de laboratorio

Los resultados de los análisis de las muestras de queso fresco reflejaron recuentos de coliformes fecales (CF) que oscilaron entre >1100 NMP/g (3.0 Log NMP/g) como máximo y <3 NMP/g (0.5 Log NMP/g) como mínimo, con un valor promedio y desviación estándar de $2.3 \pm 1.04 \text{ Log NMP/g}$. Como se observa en la gráfica No. 1

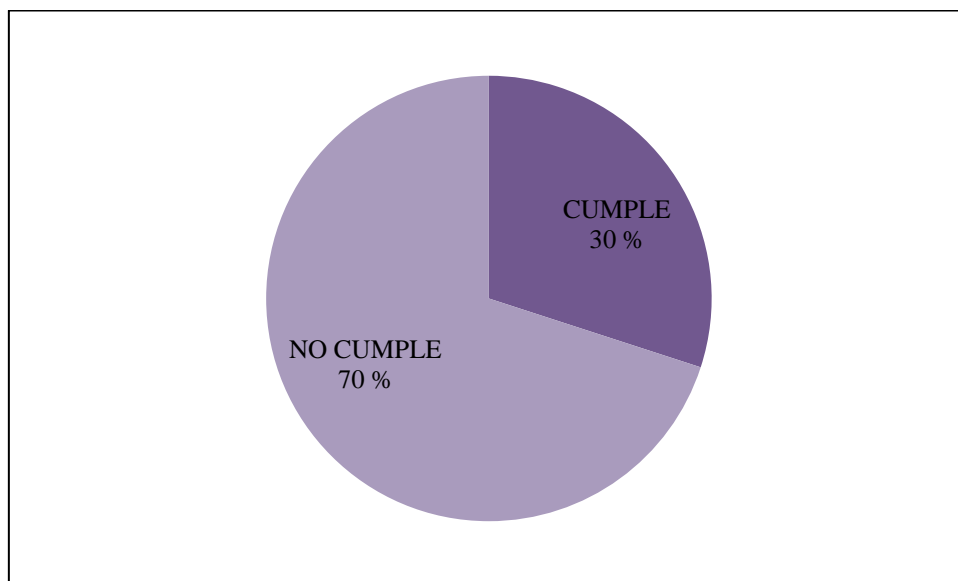


Gráfica No. 1 Representación logarítmica del NMP de coliformes fecales obtenidos en 40 muestras de queso fresco de venta en mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla. Fuente: Tabla No. 5

La elevada presencia de coliformes fecales en las muestras, no indica necesariamente contaminación por el hombre en el caso especial de los quesos, ya que la misma puede deberse a diversas causas, que van desde el origen de la leche hasta el manejo inadecuado del mismo producto posterior a su elaboración. Sin embargo, la presencia de *E. coli* representa un peligro latente para el consumidor, dado que este microorganismo también es causante de enfermedades gastrointestinales severas en algunos casos.

Es importante señalar que los productos que se comercializan en los mercados seleccionados para el muestreo provienen de pequeños empresarios, los cuales no siempre cuentan con la infraestructura necesaria para establecer controles de calidad adecuados en la elaboración de sus productos.

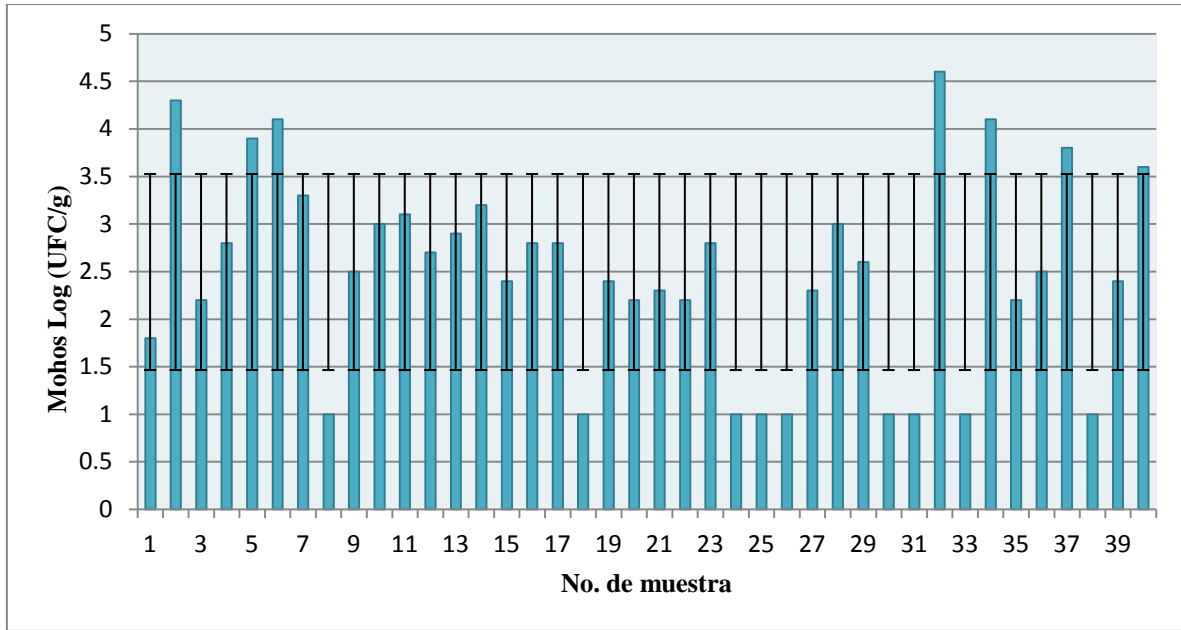
La NOM-243-SSA1-2010 establece como límite máximo permitido 100 UFC/g de *E. coli* (2 Log UFC/g) (29). Conforme a este parámetro, el 30 % (12/40) de las muestras se encontraron por debajo del valor máximo permitido para el caso de coliformes fecales, lo cual puede observarse en la gráfica No. 2



Gráfica No. 2 Cumplimiento de los resultados obtenidos en muestras de queso fresco provenientes de mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla en base con la NOM-243-SSA1-2010: Coliformes fecales. Fuente: Tabla No. 4

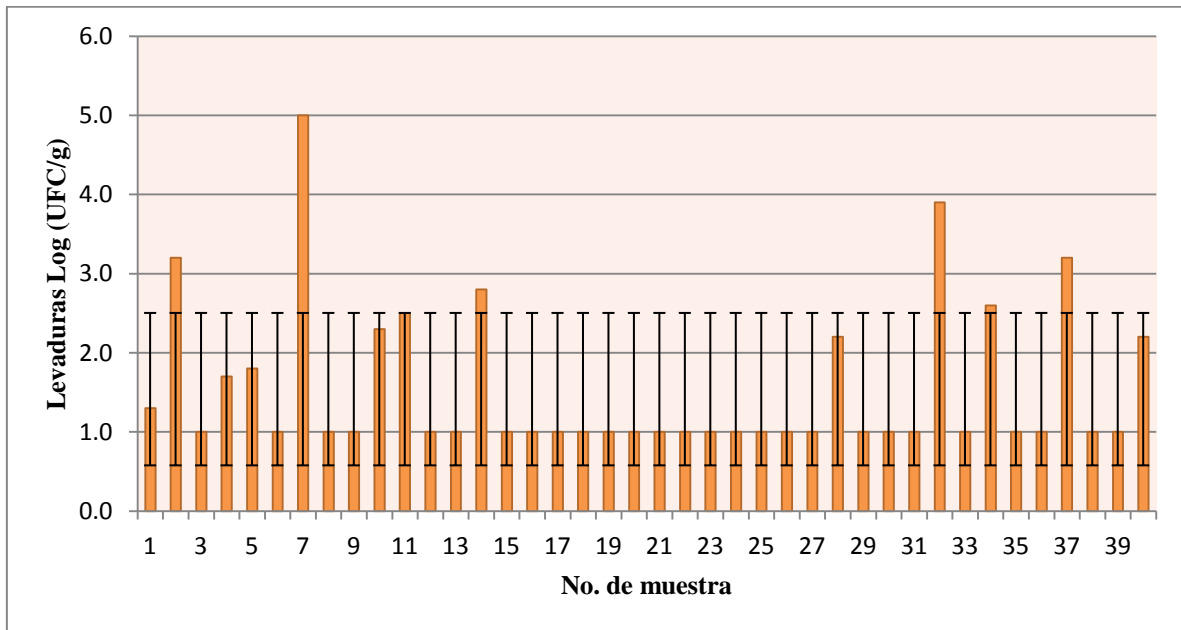
Los resultados obtenidos en la investigación son similares a los realizados por Félix y col. (9), Quintero (20) y Marrufo (15).

Respecto a los recuentos de hongos y levaduras (H y L) presentaron valores que oscilaron entre 42000 UFC/g (4.6 Log UFC/g) siendo el máximo y <10 UFC/g (1 Log UFC/g) el mínimo obteniendo un valor promedio y desviación estándar de 2.5 ± 1.0 Log UFC/g para el caso específico de los hongos, como se observa en la gráfica No. 3



Gráfica No. 3 Representación logarítmica de las UFC/g de hongos obtenidos en 40 muestras de queso fresco de venta en mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla. Fuente: Tabla No. 5

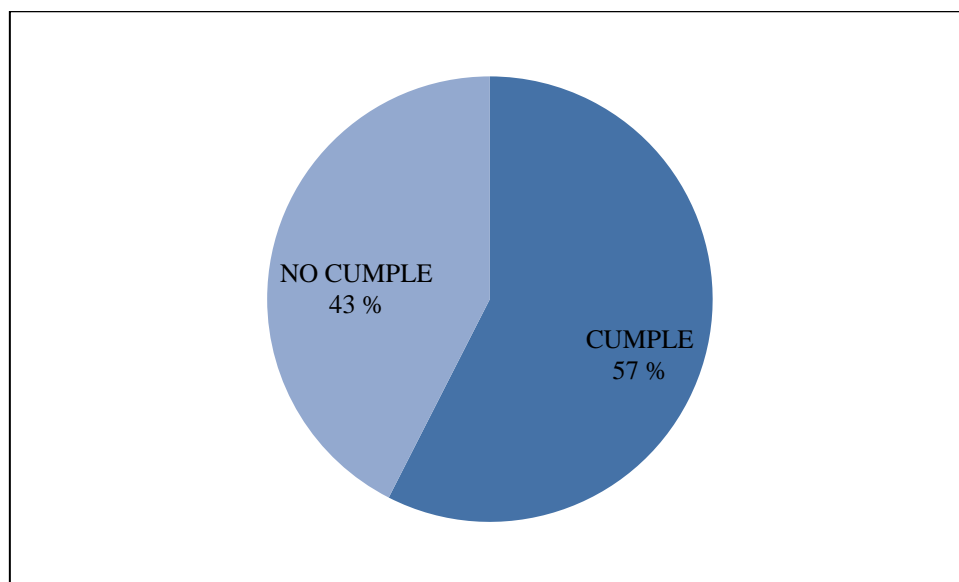
Mientras que para las levaduras se obtuvieron 112000 UFC/g (5 Log UFC/g) como máximo y <10 UFC/g (1 Log UFC/g) como mínimo, con un valor promedio y desviación estándar de 1.5 ± 0.97 Log UFC/g, como puede observarse en la gráfica No. 4



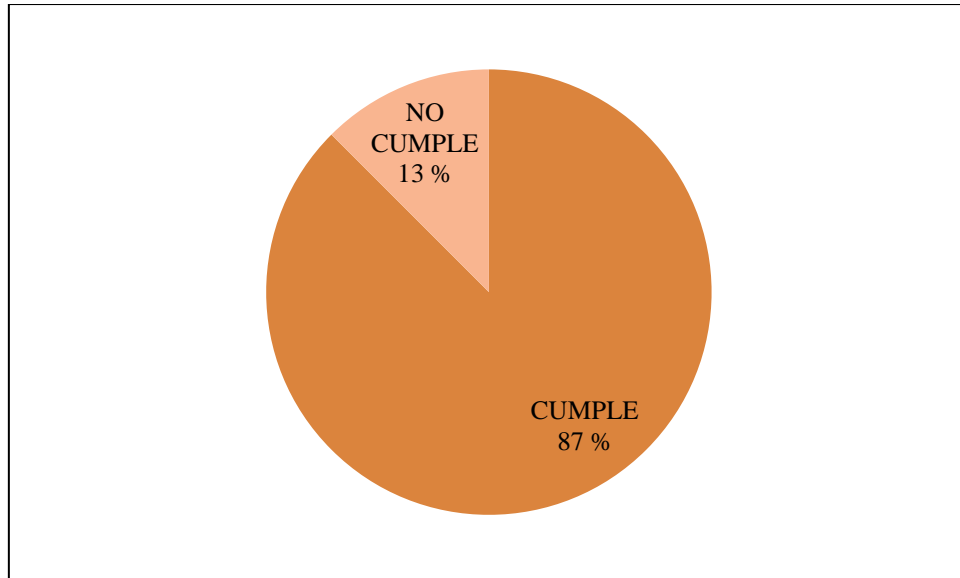
Gráfica No. 4 Representación logarítmica de las UFC/g de levaduras obtenidos en 40 muestras de queso fresco de venta en mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla. Fuente: Tabla No. 5

El significado sanitario de la presencia de hongos y levaduras en los quesos es indicador de la calidad de la materia prima con la que se elaboran los productos, así como de las condiciones de almacenamiento; por lo que los resultados obtenidos sugieren que solo la mitad de las muestras se mantuvieron en condiciones adecuadas de almacenamiento y/o transporte. No obstante, no se puede afirmar que la materia prima no fue adecuada, debido a que se desconoce la forma de elaboración de cada producto. La presencia de hongos filamentosos principalmente puede llegar a representar un peligro para la salud del consumidor debido a que este tipo de microorganismos tiene la capacidad de producir toxinas que generalmente son dañinas para el ser humano.

La NOM-243-SSA1-2010 establece como límite máximo permitido 500 UFC/g de hongos y levaduras (2.7 Log UFC/g) (29). Conforme a este parámetro 57 % (23/40) tuvieron valores aceptables en cuanto a la presencia de hongos y 87 % (35/40) para la especificación referente a levaduras, lo cual puede observarse en las gráficas No. 5 y No. 6



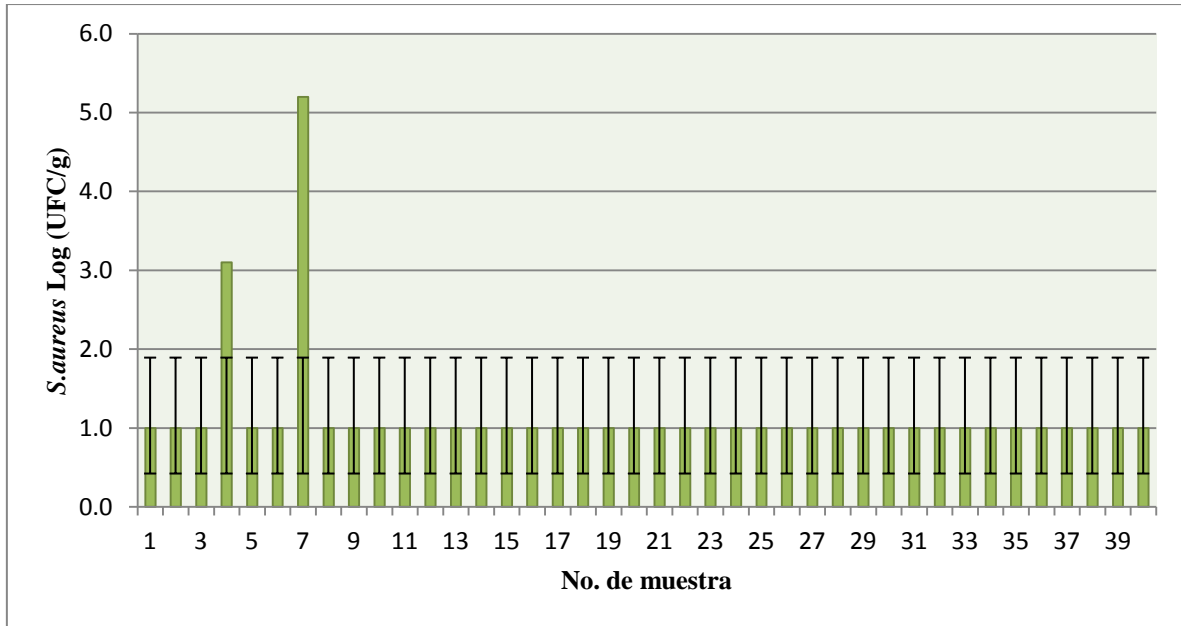
Gráfica No. 5 Cumplimiento de los resultados obtenidos en muestras de queso fresco provenientes de mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla en base con la NOM-243-SSA1-2010: Hongos.
Fuente: Tabla No. 4



Gráfica No. 6 Cumplimiento de los resultados obtenidos en muestras de queso fresco provenientes de mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla en base con la NOM-243-SSA1-2010: Levaduras.
Fuente: Tabla No. 4

Los estudios realizados por Marrufo (15) en el Estado de México en 2011, donde se analizaron 30 quesos tipo panela a nivel mercado sobre ruedas y tianguis reportan que el 70 % (21/30) de las muestras presentaron mohos y levaduras, de las cuales solo el 6.67 % (2/30) estuvieron fuera de la NOM. (29)

Para el caso de *S. aureus* se obtuvieron valores de 160000 UFC/g (5.2 Log UFC/g) y 1400 UFC/g (3.1 Log UFC/g) en solo dos muestras, para el resto de ellas el valor fue <10 UFC/g (1 Log UFC/g), como se observa en la gráfica No. 7

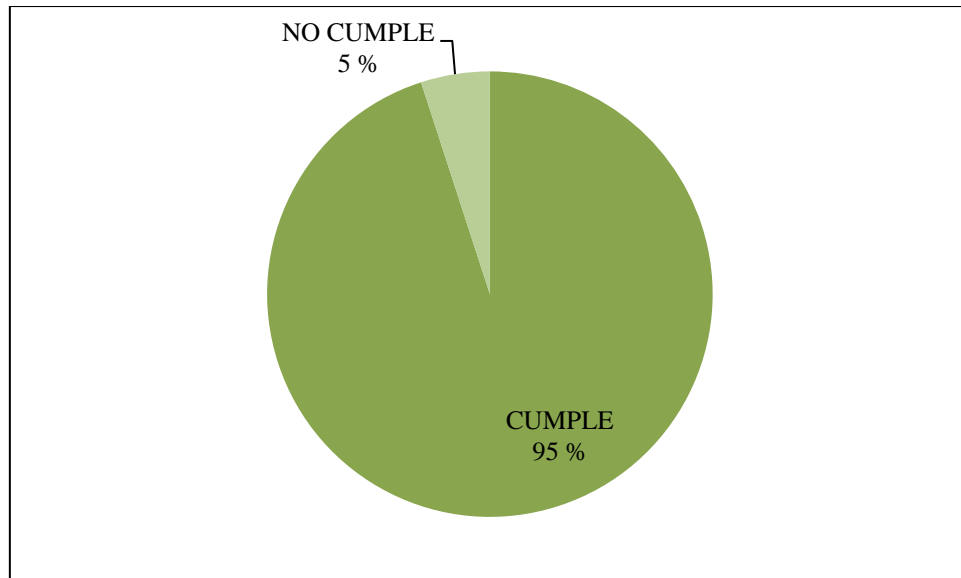


Gráfica No. 7 Representación logarítmica de las UFC/g de *S. aureus* obtenidos en 40 muestras de queso fresco de venta en mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla. Fuente: Tabla No. 5

Los resultados para *S. aureus* muestran una baja incidencia del microorganismo, por lo cual se puede inferir que el menor número de muestras tuvo contacto con los manipuladores previo a su venta, esto debido a que el microorganismo se encuentra presente principalmente en piel y mucosas humanas. La escasa presencia de este microorganismo dentro de las muestras indica que no existe riesgo potencial para el consumidor ya que la producción y concentración de toxinas es mínima.

La NOM-243-SSA1-2010 establece que para el caso de los quesos frescos, los valores máximos permitidos de *S. aureus* son de 1000 UFC/g (3 Log UFC/g) (29). Únicamente el 5 % (2/40) de las muestras tuvieron valores fuera de lo permitido, por lo que el 95 % (38/40) restante se encontró dentro de lo que marca la NOM, lo cual se representa en la gráfica No.

8



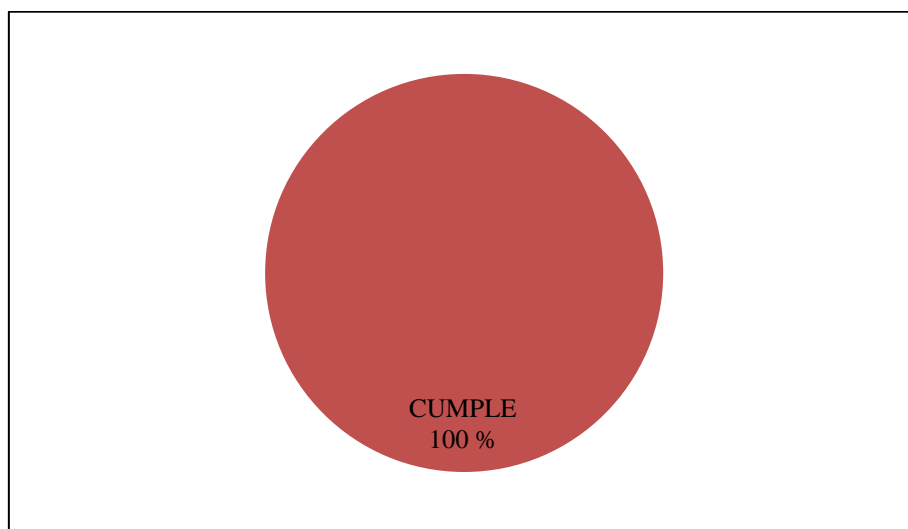
Gráfica No. 8 Cumplimiento de los resultados obtenidos en muestras de queso fresco provenientes de mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla en base con la NOM-243-SSA1-2010: *S. aureus*. Fuente: Tabla No. 4

Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Marrufo (15) y Quintero (20). No se recuperó ninguna cepa de *Salmonella* sp. ni de *Listeria monocytogenes*. El hecho de que estos dos patógenos no se encontraran en las muestras puede sugerir que hasta cierto punto los productores de estos quesos controlan la presencia de microorganismos patógenos, evidenciando así que la inocuidad para la venta de quesos frescos es la mínima necesaria establecida por la autoridad sanitaria; otra causa de la ausencia de estos microorganismos dentro de las muestras puede ser que las condiciones de cada uno de los quesos no permitieron su desarrollo y posterior recuperación aún con las técnicas de pre-enriquecimiento. Sin embargo, se recuperó una cepa perteneciente al género *Listeria*, identificada como *Listeria seeligeri*.

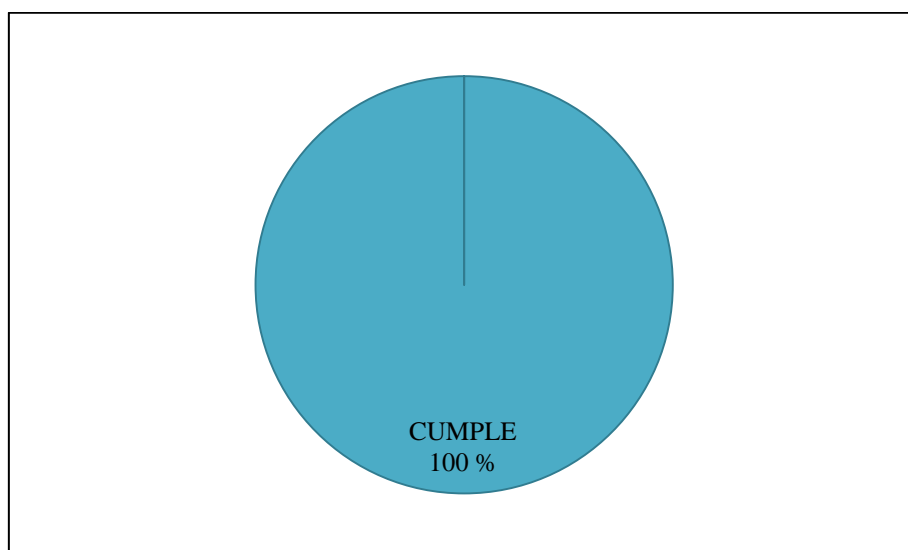
Se ha documentado en la bibliografía que *L. seeligeri* no se considera experimentalmente como una bacteria patógena. Hasta el momento Rocourt y col. (21) ha reportado un solo caso de infección humana en un adulto inmunocompetente con meningitis purulenta aguda causada por *L. seeligeri*. El paciente se recuperó rápidamente después de la administración de ampicilina y gentamicina, pero desarrolló graves secuelas neurológicas (epilepsia, hidrocefalia) un año después del episodio agudo. Esta evidencia puede sugerir que *L. seeligeri*, puede causar daños severos en pacientes previamente sanos, por tal razón

encontrarla en alimentos crudos podría ser un peligro latente para cualquier grupo de consumidores, pero esencialmente para aquellos grupos vulnerables.

La NOM-243-SSA1-2010 establece que *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* deben estar ausentes en 25g de muestra en el caso de quesos frescos (29). Por lo tanto, el 100 % de las muestras cumple con la especificación como lo muestran las siguientes gráficas.



Gráfica No. 9 Cumplimiento de los resultados obtenidos en muestras de queso fresco provenientes de mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla en base con la NOM-243-SSA1-2010: *Salmonella* sp. Fuente: Tabla No. 4



Gráfica No. 10 Cumplimiento de los resultados obtenidos en muestras de queso fresco provenientes de mercados públicos de la zona Norte de la Ciudad de Puebla en base con la NOM-243-SSA1-2010: *Listeria monocytogenes*. Fuente: Tabla No.4

Los estudios realizados por Felix y col. (9) en Ciudad Obregón, Sonora, y por Marrufo (15) en el Estado de México fueron similares a nuestra investigación en la búsqueda de este patógeno gastrointestinal: ausencia de *Salmonella* sp. en quesos frescos.

A pesar de lo anterior, Albarracín en 2006 (1) realizó un estudio para investigar la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp. en 185 quesos, logrando aislar 31 cepas correspondientes al género *Listeria*: 11 de *Listeria monocytogenes* y 20 de otras especies. Para el caso de *Salmonella* sp. no se encontró evidencia de ella en los productos analizados. Mientras que Alcázar (2) realizó un estudio para detectar *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de venta en “mercados sobre ruedas”; se analizaron 120 muestras por PCR y solo tres cepas resultaron positivas a *Salmonella* sp., pero, en ninguna muestra estuvo presente *L. monocytogenes*, en contraste con los resultados de los métodos bacteriológicos, por medio de los cuales no se obtuvo ningún resultado positivo.

Sin embargo, en otras investigaciones Martino y col. (14), Baquero y col. (3), y Muñoz y col. (17) han recuperado *L. monocytogenes*, *L. innocua* y *L. welshimeri* en otro tipo de quesos.

10. CONCLUSIONES.

- ❖ Los quesos de venta en los mercados públicos donde se obtuvieron las muestras cumplen con los parámetros establecidos por la NOM-243-SSA1-2010 para *Staphylococcus aureus* y Levaduras; excepto el 5% del total de muestras en el caso de *S. aureus* y 13% para la cuenta de levaduras.

- ❖ Los quesos de venta en los mercados públicos donde se obtuvieron las muestras no cumplen con los parámetros establecidos por la NOM-243-SSA1-2010, debido a que el 70% de las muestras se encuentran por arriba de los valores permitidos para coliformes fecales, y el 43% por arriba de los valores permitidos para Hongos.

- ❖ La ausencia de patógenos (*Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*) no refleja necesariamente la total seguridad en cuestiones de salud en este tipo de alimentos, aún cuando no se aisló ninguno de los microorganismos ya mencionados en este trabajo.

- ❖ Se logró aislar e identificar una cepa de *Listeria seeligeri*, la cual no se considera como un patógeno en potencia, pero puede causar daños a pacientes inmunocompetentes.

- ❖ La evaluación de la calidad sanitaria de los quesos de venta en mercados públicos de la zona Norte de la Cd. de Puebla permite observar que el cumplimiento de los requisitos de inocuidad mínimos necesarios no se lleva a cabo en su totalidad.

Por lo anterior se recomienda realizar evaluaciones periódicas de los alimentos en general que se encuentren a la venta en este tipo de establecimientos. Del mismo modo, sería importante unificar las condiciones de almacenamiento en el punto de venta de alimentos perecederos, así como organizar campañas para la difusión de información con respecto a la calidad e inocuidad de los alimentos.

11. BIBLIOGRAFIA

1. Albarracín, F.Y., Sarmiento, P., Carrascal, A.K. y Mercado, M. (2006). Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* sp. en quesos frescos (quesos de hoja, cuajada) y queso Doble Crema producidos y comercializados en el Municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 4(2), octubre, pp.30-41.
2. Alcázar, M.C.D., Rubio, L.M.S., Núñez, E.F. y Alonso, M.R.A. (2006). Detección de *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México. *Veterinaria México OA*. 37(4), pp.417-429.
3. Baquero, A.D., Bernal, G.A. y Campuzano, S., (2006). Determinación de *L.monocytogenes* en quesos blancos artesanales expandidos en la plaza de mercado de Cáqueza, Cundinamarca. *NOVA Publicación científica en Ciencias Biomédicas*, 4(6) junio-diciembre, pp. 80-83.
4. Bourgeois, C.M.; Mescle, J.F y Zucca, J. (1994). Microbiología alimentaria vol.1 Aspectos microbiológicos de la seguridad y calidad alimentaria. Zaragoza, España: Acribia, S.A. pp. 53-64, 117-120, 181-191.
5. Callejo, R., Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, F., Martínez, G., (2008). Manual de procedimientos. Aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur.
6. Díaz, R.C., y González, G.B, (2001). *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. *Revista Salud Pública y Nutrición*. julio-septiembre 2(3). Consultado: 01 de septiembre de 2015: <http://www.respyn.uanl.mx/ii/3/articulos/saureus-1.html>
7. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J. (1997). Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Zaragoza, España: Acribia, S.A. pp. 69, 133-157, 355- 367, 395, 405, 406,
8. Esesarte, G.E. (2002). Higiene en alimentos y bebidas (5ª ed). México: Trillas. p. 68.

9. Félix-Fuentes, A., Campas-Baypoli, O.N. y Meza-Montenegro, M., (2005). Calidad sanitaria de alimentos disponibles al público de Ciudad Obregón, Sonora, México. *Revista Salud Pública y Nutrición*. 6(3), julio-septiembre. Consultado: 30 de agosto de 2015: http://www.respyn.uanl.mx/vi/3/articulos/calidad_sanitaria.htm
10. Fernández, E, 1981. *Microbiología sanitaria: agua y alimentos*. Vol. 1. Universidad Guadalajara, México, D.F., p.175.
11. Forsythe, S. (2000). *Alimentos seguros: microbiología*. (1ª ed.). Zaragoza, España: Acribia, S.A. pp. 151,
12. Frazier, W.C., y Westhoff, D.C. (1988). *Microbiología de los alimentos* (4ª ed.). Zaragoza, España: Acribia, S.A. pp. 547-556,
13. James, M.J. (1992). *Microbiología Moderna de los Alimentos* (3ª ed.). Zaragoza, España: Acribia, S.A. pp.281,496,
14. Martino, Z.T., Leyva, C.V., Pérez, C.A., De los Reyes, M., Suárez, H.F. y Lara, O.C., (2005). Determinación de *Listeria* sp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Revista Cubana de Salud Pública*, 31(3), julio- septiembre, pp. 217-222.
15. Marrufo, P.M. (2011). *Calidad sanitaria del queso tipo panela a nivel de mercado sobre ruedas y tianguis*. Manuscrito no publicado, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México. Consultado: 03 de marzo de 2016: <http://132.248.9.195/ptd2012/mayo/0680264/Index.html>
16. Mossel, D.A.A., y Moreno G.B. (1982). *Microbiología de los Alimentos*. Zaragoza, España: Acribia, S.A. pp. 413, 414,
17. Muñoz, A.I., Vargas, M., Otero, L., Díaz, G. y Guzmán, V. (2011). Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercado y *delicatessen* de supermercados de cadena, Bogotá, D.C, 2002-2008. *Biomédica*, 31, agosto, pp. 428-439.
18. Palacios, V.S. (2006). *Caracterización microbiológica de diversos tipos de quesos elaborados en el Valle de Tulancingo Hidalgo*. Manuscrito no publicado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. Consultado: 19 de marzo de 2015: <http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/bitstream/231104/507/1/Caracterizacion%20microbiologica%20de%20quesos.pdf#page=14&zoom=auto,-12,625>

19. Puig, P.Y., Robert, M.B.A. y Leyva, C.V. (2013). Factores epidemiológicos de interés en brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en La Habana. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol*, septiembre-diciembre, pp. 262-268.
20. Quintero, P.A. (2009). Evaluación de la calidad higiénico-sanitaria de quesos frescos artesanales que se consumen en la Ciudad de México. Manuscrito no publicado, Universidad Nacional Autónoma de México, México. D.F. Consultado: 03 de marzo de 2016: <http://132.248.9.195/ptd2009/marzo/0641466/Index.html>
21. Rocourt, J., Hof, H., Schrettenbrunner, A., Malinverni, R., y Bille, J. (1986). Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 116:248-251.
22. Sánchez, A.B. y Palencia, H.E. (2010). Infecciones por *Listeria*. *Medicine*, 10(50), pp. 3368-3372.
23. Schöbitz, R., Ciampi, L. y Nahuelquin, Y. (2009). *Listeria monocytogenes* un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, 37(1), pp. 1-8.
24. Secretaría de Salud (1994a). Norma Oficial Mexicana NOM-111-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos. Publicación en el DOF: 13 de septiembre de 1995.
25. Secretaría de Salud (1994b). Norma Oficial Mexicana NOM-112-SSA1-1994, Bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable. Publicación en el DOF: 19 de octubre de 1995.
26. Secretaría de Salud (1994c). Norma Oficial Mexicana NOM-114-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. Publicación en el DOF: 22 de septiembre de 1995.
27. Secretaría de Salud (1994d). Norma Oficial Mexicana NOM-115-SSA1-1994. Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. Publicación en el DOF: 25 de septiembre de 1995
28. Secretaría de Salud (1995). Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995. Bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Publicación en el DOF: 19 de noviembre de 1997.
29. Secretaría de Salud (2010). Norma Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos.

Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba. Publicación en el DOF: 27 de septiembre de 2010.

30. Suárez, F.Y., Soca, P.M., Fabré, R.Y., Sánchez, R.S., Quintana, G.J., Rojo, F.R., Fuentes, C.M., Barrios, A., Guerrero, Y., Castro, R., Martínez, A., Cepero, O. y Castillo, J.C., (2007). Estudio de algunos indicadores de riesgo asociados al manejo local de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, VIII agosto, pp. 1-11.

31. Vera, A., González, G., Domínguez, M. y Bello, H. (2013). Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. Rev. chil. infectol, 30(4) agosto, pp. 407-416.

12. ANEXOS



Fotografía 1. Materiales listos para el procesamiento de las muestras.



Fotografía 2. Muestras dispuestas para ser procesadas.



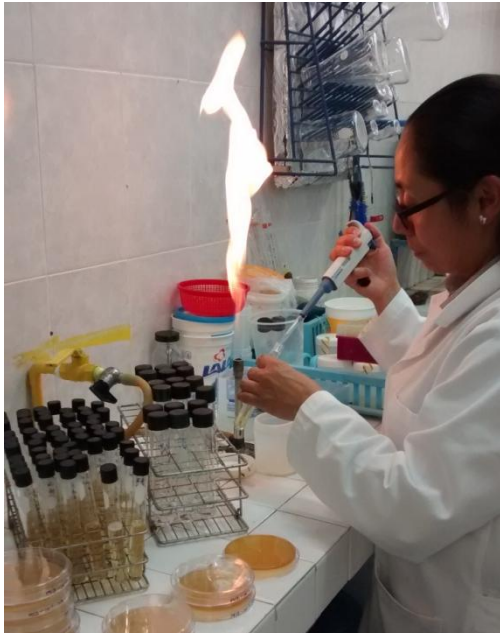
Fotografía 3. Preparación de diluciones de las muestras.



Fotografía 4. Inoculación de placas para el recuento de mohos y levaduras.



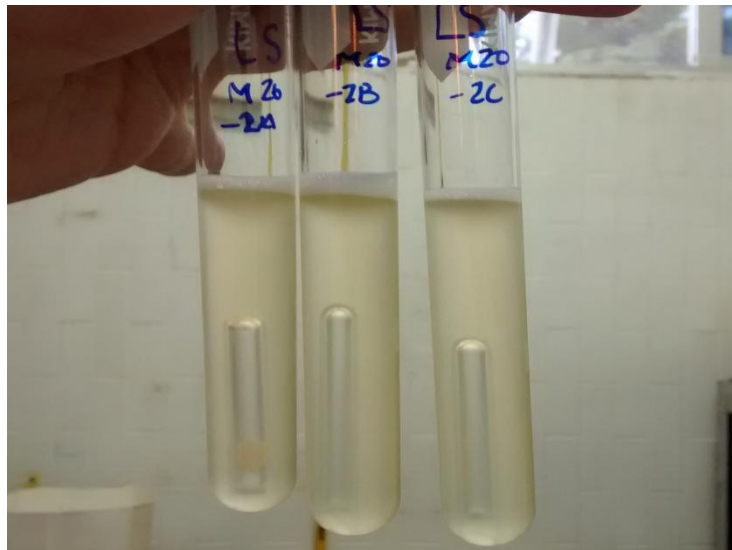
Fotografía 5. Vertido del agar PDA acidificado en las placas inoculadas.



Fotografía 6. Inoculación de tubos de caldo Lauril sulfato de sodio para la determinación de coliformes fecales por la técnica del NMP.



Fotografía 7. Inoculación de tubos de caldo *E. coli* a partir de caldo Lauril sulfato positivo.



Fotografía 8. Tubos de caldo Lauril sulfato positivos, se observa turbidez en el caldo y la formación de gas (campanas Durham).



Fotografía 9. Colonia presuntiva de *S.aureus* en agar Baird-Parker; se observa halo de precipitación alrededor de la colonia.



Fotografía 10. Tubo con plasma inoculado con la colonia presuntiva de *S.aureus* para la prueba de coagulasa.



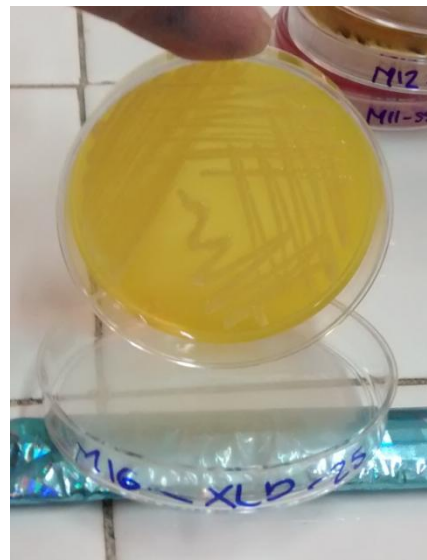
Fotografía 11. Pre-enriquecimiento para *Salmonella* sp. en caldo lactosado.



Fotografía 12. Enriquecimiento para *Salmonella* sp. en caldo Rappaport y tetrionato.



Fotografía 13. Aislamiento en medio *Salmonella* – *Shigella*.



Fotografía 14. Aislamiento en medio XLD.



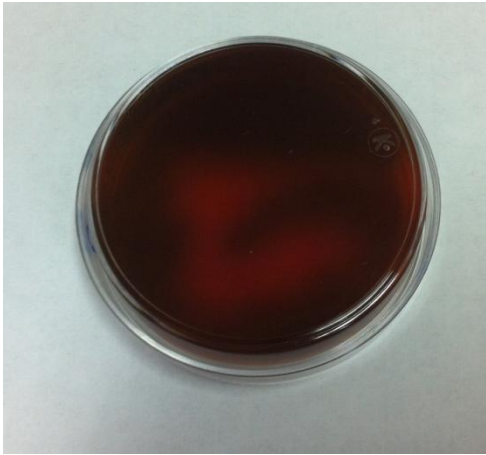
Fotografía 15. Batería de pruebas bioquímicas (negativas para *Salmonella* sp.).



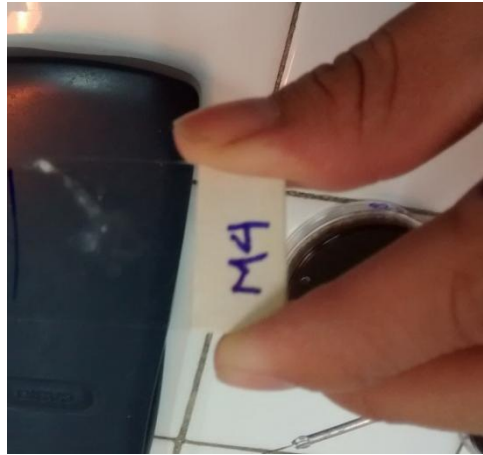
Fotografía 16. Enriquecimiento en caldo *Listeria* para *Listeria* sp.



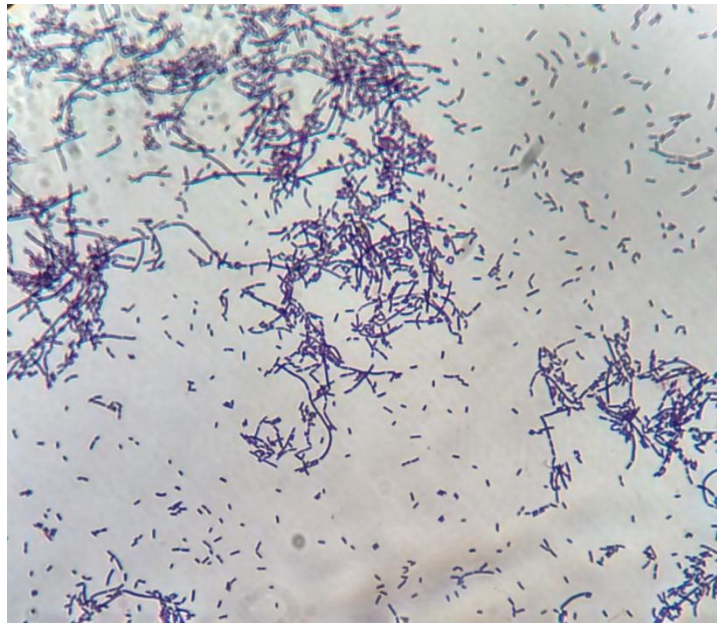
Fotografía 17. Siembra en agar Palcam a partir de caldo *Listeria*.



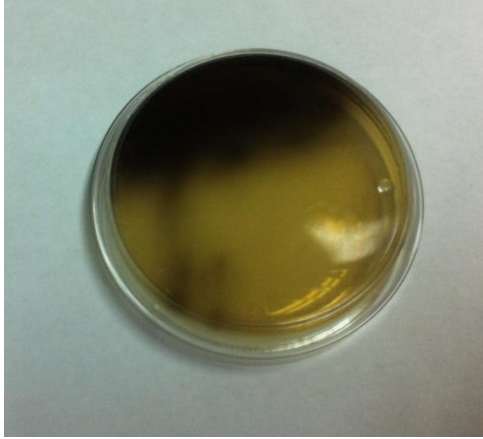
Fotografía 18. Crecimiento sugestivo de *Listeria* sp. en agar Palcam después de 48 horas de incubación.



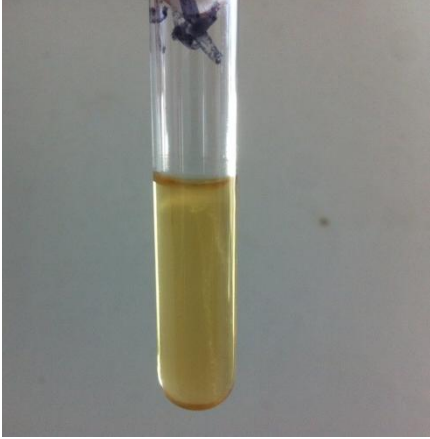
Fotografía 19. Prueba de catalasa positiva para cepa presuntiva de *Listeria* sp.



Fotografía 20. Tinción de Gram para cepa presuntiva de *Listeria* sp. cocobacilos (bacilos cortos) Grampositivos.



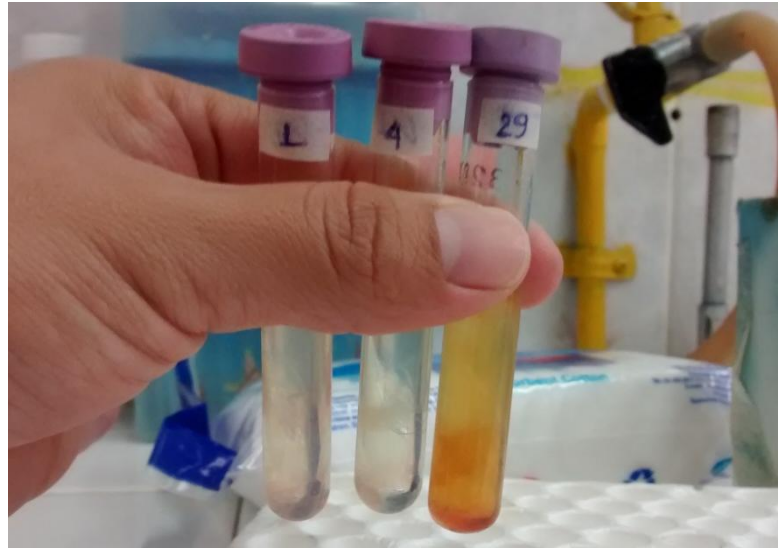
Fotografía 21. Utilización de la esculina en agar bilis-esculina para cepa presuntiva de *Listeria* sp.



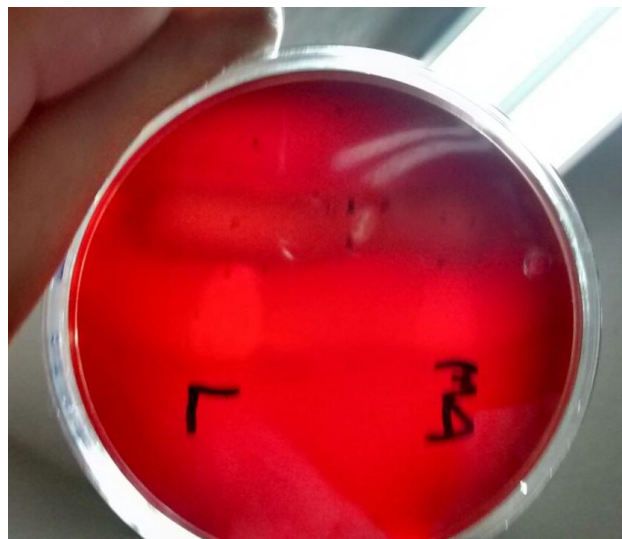
Fotografía 22. Prueba de movilidad positiva en medio SIM para cepa presuntiva de *Listeria* sp.



Fotografía 23. Prueba de hemólisis positiva en agar sangre de carnero para cepa presuntiva de *Listeria* sp.



Fotografía 24. Prueba de reducción de nitratos negativa para la cepa control (L) y para la cepa presuntiva de *Listeria* sp.(4) en contraste con otra cepa (29) positiva.



Fotografía 25. Prueba de CAMP positiva para la cepa control (L) y para la cepa presuntiva de *Listeria* sp. (M4). Se observa la figura semejante a una cabeza de fósforo.



Fotografía 26. Prueba de detección rápida de *L.monocytogenes* positiva para la cepa control (izquierda) y negativa para la cepa presuntiva de *Listeria* sp. (derecha).

HOSPITAL INF DE MEXICO DR FEDERICO GOMEZ

Nº de cliente:
Equipo Nº:

Informe de examen

Editado 08-oct-2015 12:44 CST
Editado por: LabSuper

Nombre del paciente:
Examen: M4 ASC-1

Nº paciente:
Sección: FARINGEOS

Bionúmero: 542000244733621
Organismo seleccionado: Listeria seeligeri

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 242361740	Fecha caduc.: 08-nov-2016 12:00 CST
	Finalizado: 07-oct-2015 23:40 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 7,00 horas
Organismo seleccionado	95% Probabilidad Listeria seeligeri		Nivel de confianza: Identificación muy buena
Organismo SRF	Bionúmero: 542000244733621		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis: No se requieren los siguientes antibióticos: Detección de cefoxitina, Bencilpenicilina, Ampicilina, Oxacilina, Gentamicina de nivel alto (sinergia), Estreptomicina de nivel alto (sinergia), Gentamicina, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Moxifloxacino, Resistencia inducible a clindamicina, Eritromicina, Clindamicina, Quinupristina/Dalfopristina, Linezolid, Vancomicina, Tetraciclina, Tigeciclina, Nitrofurantoína, Rifampicina, Trimetoprima/Sulfametoxazol,			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s) Listeria seeligeri dGAL(1),			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 05.04
Guía de interpretación de CMI: Copia de Global CLSI-based

Guía de interpretación terapéutica: Copia de NATURAL RESISTANCE

Nombre de juego de parámetros de AES: Copia de Global CLSI-based+Natural Resistance

Última modificación de parámetros de AES: 07-ago-2014 12:45 CST

Página 1 de 2

Fotografía 27. Informe de la confirmación de la cepa de *L.seeligeri* enviada por el Hospital Infantil de México Federico Gómez.