



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“Incidencia de *Listeria monocytogenes* en
quesos frescos no pasteurizados provenientes
de diferentes mercados de la ciudad de Puebla
determinada mediante PCR.”**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

Licenciatura en Ingeniería en Alimentos

Presenta:

Guadalupe Karen Báez Moreno

Director de Tesis:

D.C. Fabiola Avelino Flores

Puebla, Pue. Octubre 2018

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por abrirme las puertas y permitirme formar parte de esta gran casa de estudios, además por apoyar mi formación profesional. Así como también a los distintos docentes quienes se esforzaron día a día para brindar sus conocimientos y apoyo.

El desarrollo de esta tesis no se describe como algo sencillo, sin embargo puedo afirmar que durante la realización del proyecto disfruté cada investigación, análisis, y en general de todo el proceso, haciendo que la conclusión de este trabajo cumpla con mis expectativas.

Por lo cual también quiero agradecer de manera muy especial a mi asesora la Dra. Fabiola Avelino, en primer lugar por aceptarme para realizar esta tesis y otros trabajos de investigación, por todo el conocimiento que ha compartido conmigo a lo largo de casi 3 años, por el apoyo que siempre me brindó, y sobre todo por la enorme paciencia que tuvo para guiarme durante el desarrollo de esta tesis.

Además agradezco al proyecto VIEP AVFF-NAT15-171 por el financiamiento para la realización del trabajo experimental.

Y por último al Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla donde viví grandes momentos, a las doctoras encargadas y los compañeros que trabajan ahí, quienes me dejan muchas enseñanzas.

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mis padres, quienes son los principales promotores de mis sueños, quienes creen en mí y que gracias a sus expectativas eh alcanzado distintos objetivos. A mi madre por estar dispuesta a acompañarme durante esas largas y agotadoras noches de estudio. A mi padre por cada consejo y todas esas palabras que me han guiado en la vida.

También quiero dedicar esta tesis y todo el trabajo que representó a mi novio por creer siempre en mi capacidad y por su apoyo incondicional, comprensión y cariño. Por acompañarme durante las extensas jornadas de análisis, y por todos los consejos y aportes para la mejora del trabajo.

A mi familia porque todos ellos representan los cimientos de mi desarrollo tanto personal como profesional, ya que han dedicado su tiempo para enseñarme cosas nuevas y otorgarme aportes invaluable que mantendré presentes siempre.

Y por último a todas las personas que apoyaron y creyeron en la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	i
Introducción.....	1
Capitulo 1. Antecedentes	2
Planteamiento del problema	2
Justificación	3
Objetivos.....	4
Objetivos específicos.....	4
Hipótesis.....	4
Capitulo 2. Marco teórico	5
2.1. Inocuidad Alimentaria	5
2.2. Definición de ETA.....	5
2.3. <i>Listeria monocytogenes</i>	5
2.3.1 Factores de patogenicidad	6
2.3.2 Invasión intracelular.....	6
2.4. Listeriosis.....	6
2.5. Epidemiología	7
2.5.1 Incidencia.....	7
2.5.2 Presencia en alimentos.....	7
2.5.3 Brotes asociados a quesos	8
2.6. Queso	9
2.6.1 Elaboración Artesanal de Queso	9
2.7 Trazabilidad.....	9

2.8. Métodos de detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.8.1 Método microbiológico	10
2.8.2 Prueba de movilidad	11
2.8.3 Prueba de hemólisis.....	11
2.8.4 Prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP)	11
2.8.5 Serología.....	12
2.8.6 Reacción en Cadena Polimerasa (PCR).....	12
2.8.6.1 Fundamento	12
2.8.6.1.1 Listeriolisina O.....	13
2.8.6.1.2 <i>p60</i> e <i>iap</i>	13
Capitulo 3. Metodología	14
3.1. Ubicación Espacio-temporal	14
3.1.1 Muestras	14
3.1.2 Toma de Muestra	15
3.1.3 Análisis de las Muestras	15
3.2. Estandarización de la técnica de PCR a partir de la cepa de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111.....	17
3.2.1 Microorganismo empleado.....	17
3.2.2 Descongelación y aislamiento de la cepa tipo	17
3.2.3 Extracción de ADN a partir de la cepa tipo	17
3.2.4 Visualización del ADN por Electroforesis	18
3.2.5 Técnica de PCR para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i>	18
3.2.6 Visualización de los productos de PCR por Electroforesis.....	18
3.3. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de queso fresco	19

3.3.1 Extracción de ADN a partir de las muestras de queso fresco	19
3.3.2 Técnica de PCR para la identificación de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de queso fresco.....	19
3.4. Análisis Microbiológico para Indicadores de Calidad.....	20
3.4.1 Preparación de la muestra	20
3.4.2 Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i>	20
3.4.3 Determinación de <i>Salmonella</i>	21
3.4.4 Determinación de Mohos y Levaduras.....	21
3.4.5 Determinación de <i>Escherichia coli</i>	22
Capitulo 4. Resultados y discusión	23
4.1.1 Muestras	23
4.1.2. Estandarización de la técnica de PCR a partir de la cepa de <i>L. monocytogenes</i> ATCC 19111	24
4.1.3. Detección de <i>Listeria monocytogenes</i> en muestras de queso fresco ..	28
4.1.4. Análisis Microbiológico para Indicadores de Calidad	33
Conclusiones.....	44
Bibliografía	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Brotos de listeriosis confirmada transmitida por queso</i>	8
Tabla 2. <i>Cepas de colección empleadas en la prueba de CAMP</i>	11
Tabla 3. <i>Variables estandarizadas para la Técnica de PCR</i>	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa satelital donde se muestra la ubicación geográfica de los mercados de la ciudad de Puebla que fueron incluidos en el estudio. Fuente: INEGI.	14
Figura 2. Esquema que muestra la metodología general de trabajo.	16
Figura 3. Gráfico que muestra el número de quesos frescos no pasteurizados analizados por lugar de procedencia	23
Figura 4. Gel de agarosa donde se muestran los resultados para la extracción de ADN bacteriano 1) Marcador de tamaño molecular, 2-9) ADN de <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111.....	24
Figura 5. Gel de agarosa donde se muestran los amplicones para los genes <i>iap 60</i> y <i>hly</i> de <i>L. monocytogenes</i> , 1) Marcador de tamaño molecular, 2-5) Amplicones negativos, 6) Control positivo para el gen <i>iap 60</i> , 7) Control negativo, 8) Control positivo para el gen <i>hly</i> , 9) Control negativo.	25
Figura 6. BLAST de la secuencia correspondiente a la cepa tipo con el iniciador para oligonucleótido que codifica para el gen <i>hly</i>	26

Figura 7. Gel de agarosa donde se muestran los amplicones de las muestras de queso para el gen <i>hly</i> de <i>L. monocytogenes</i> , provenientes del mercado “I” 1) Marcador de tamaño molecular, 2) Control positivo, 3) Control negativo 4-8), Amplicones de muestras positivos.	28
Figura 8. Gel de agarosa donde se muestran los amplicones de las muestras de queso para el gen <i>hly</i> de <i>L. monocytogenes</i> , provenientes del mercado “C” 1) Marcador de tamaño molecular, 2) Control positivo, 3) Control negativo 4-6), Amplicones de muestras positivos 7-9) Amplicones de muestras negativos.	28
Figura 9. Gráfico de porcentaje de quesos frescos no pasteurizados que dieron resultados positivos para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	29
Figura 10. Gráfico del porcentaje de mercados en los que las muestras de quesos frescos no pasteurizados dieron resultados positivos para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i>	30
Figura 11. BLAST de la secuencia correspondiente a la muestra de queso con el iniciador para oligonuclótido que codifica para el gen <i>hly</i>	32
Figura 12. Gráficos indican el porcentaje de muestras de cada indicador de calidad microbiológica que incumplen las especificaciones de la norma NOM-243-SSA1-2010.....	34
Figura 13. Gráficos de Indicadores de Calidad microbiologica de las muestras analizadas para cada mercado muestreado.	41
Figura 14. Gráfico del porcentaje general de muestras que exceden los valores máximos permisibles de la NOM-243-SSA1-2010.....	42
Figura 15. Gráfico que muestra el número de quesos frescos no pasteurizados que dieron resultados positivos para la detección de <i>Listeria monocytogenes</i> por lugar de procedencia.....	43

INTRODUCCIÓN

Actualmente una gran cantidad de derivados lácteos siguen siendo producidos de forma artesanal, entre los que se encuentra principalmente el queso fresco elaborado a partir de leche sin pasteurizar; el cual es un producto de amplio consumo por lo que se ha convertido en una importante fuente de transmisión de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's) como lo es la listeriosis, enfermedad que se considera un grave problema de salud pública debido a las complicaciones severas con las que se manifiesta y a la alta tasa de muerte que presenta.

La listeriosis humana, originada por *Listeria monocytogenes*, es transmitida por alimentos, debido a que presenta resistencia a temperaturas de refrigeración y condiciones de preservación de alimentos, se considera patógeno de interés en los humanos ya que además posee varios factores de patogenicidad.

En México y más aún en Puebla no existen datos exactos sobre la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos, y ya que se considera que los brotes más frecuentes se relacionan con el consumo de queso fresco no pasteurizado, surge la necesidad de realizar un monitoreo para determinar la calidad microbiológica de estos productos. Con este fin el propósito principal de la presente investigación fue determinar la incidencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos elaborados a partir de leche sin pasteurizar, y para ello se estandarizaron las condiciones de la técnica de PCR que resulta una técnica mucho más rápida y sensible para su detección, con respecto al método microbiológico. Así mismo uno de los objetivos de esta investigación consistió en la cuantificación de los indicadores microbiológicos (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, Mohos y Levaduras, y *Listeria monocytogenes*) en muestras de queso fresco provenientes de los mercados de la ciudad de Puebla.

CAPITULO 1. ANTECEDENTES

Planteamiento del problema

Listeria monocytogenes es el agente causal de la listeriosis, enfermedad que se estima afecta a 16,00 personas cada año, según datos del Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) que también reporta cifras de 19,600 brotes de listeriosis con 11,382 hospitalizaciones y 867 muertes del 2010 al 2016 en Estados Unidos, por lo que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) la alta tasa de muerte asociada con esta infección (20 a 30%) la convierte en un grave problema de salud pública debido a las complicaciones severas que presenta, ya que se manifiesta no solo con síntomas gastrointestinales como náuseas, diarrea y vómitos, sino que además puede causar infecciones sanguíneas, meningitis, septicemias y abortos. (Ryu *et al*, 2013) (Torres, 2005) (Castañeda *et al*, 2014)

En contraste, en México no existen datos exactos sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos ya que la información con la que se cuenta es insuficiente. Sin embargo, cabe destacar que en 2016 se reportó en México, Canadá y Estados Unidos el retiro de productos congelados por contaminación con *Listeria* abarcando más de 400 productos y dejando como consecuencia 8 enfermos y dos muertos de acuerdo con los reportes. (Excélsior, 2016)

Actualmente los brotes de listeriosis más frecuentes se relacionan con el consumo de queso fresco elaborado artesanalmente, es decir a partir de leche sin pasteurizar, debido a que una mala práctica ganadera o higiénica dentro de los establos se puede traducir en la contaminación de la leche cruda y por lo tanto de los productos derivados de esta.

Justificación

A la fecha se siguen procesando una gran cantidad de derivados lácteos de forma artesanal, entre los cuales podemos encontrar el queso fresco; que es un producto de amplio consumo debido a su bajo precio, aporte nutricional, y que es un alimento listo para consumir, lo que significa que se ha convertido en una importante fuente de transmisión de enfermedades infecciosas, y ya que no es sometido a ningún tipo de evaluación microbiológica previo para llegar al consumidor, surge la necesidad de realizar un monitoreo para determinar la calidad microbiológica de estos productos y así conocer su condición, para que los datos obtenidos contribuyan a conocer la incidencia de Enfermedades Transmitidas por Alimentos como lo es la listeriosis. Es por ello que se realizó la cuantificación de los indicadores microbiológicos con el fin de determinar la calidad de quesos frescos elaborados a partir de leche sin pasteurizar para 20 de los 22 mercados de la ciudad de Puebla. Así como la implementación de la técnica de PCR, que es una técnica mucho más rápida y sensible para la detección de *L. monocytogenes*.

Objetivos

Determinar la incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos no pasteurizados de leche de vaca, provenientes de distintos mercados de la ciudad de Puebla.

Objetivos específicos

- Estandarizar la técnica de PCR para la amplificación de los genes *iap 60* y *hly*, mediante la cual será determinada la incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos no pasteurizados.
- Conocer la calidad microbiológica de los quesos en 20 de los 22 mercados de la ciudad de Puebla, como se indica en la 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. Para determinar su cumplimiento según los valores máximos permisibles.
- Conocer la trazabilidad de los quesos para determinar el origen de aquellos que presenten contaminación con *Listeria monocytogenes*.

Hipótesis

$$H_1 = \mu > 0$$

Listeria monocytogenes está presente en los quesos frescos artesanales analizados por medio de la técnica de PCR provenientes de los mercados de la ciudad de Puebla, incumpliendo así la NORMA Oficial Mexicana NOM-243-SSA1-2010.

CAPITULO 2. MARCO TEÓRICO

2.1. Inocuidad Alimentaria

Los alimentos no son productos totalmente estériles, por lo que pueden contener poblaciones microbianas que varían en función del tipo de alimento, sin embargo, en ocasiones pueden ser vehículo de microorganismos patógenos o sus toxinas. Por lo tanto la inocuidad consiste en la ausencia de agentes nocivos a la salud, ya sean físicos, químicos o biológicos y es una condición necesaria que garantiza que los alimentos no causaran daño al consumidor. (Escartín, 2000)

2.2. Definición de ETA

Con la perdida de la inocuidad se hacen presentes las Enfermedades Transmitidas por Alimentos que producen distintos trastornos gastrointestinales, originados por la entrada de bacterias en el organismo, siendo las principales bacterias patógenas asociadas a ETA's, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli* O157: H7, y *Listeria monocytogenes*. (Eberle & Kiess, 2012) (Frazier, 1993)

2.3. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un bacilo corto, gram positivo, no esporulado, y carente de cápsula, de 1.2 x 0.5 µm. Es activamente móvil a 20° C, pero a 37° C su movilidad se vuelve nula, es anaerobio facultativo, catalasa positiva, oxidasa negativo y no ácido-resistente. Respecto a su temperatura de crecimiento, se considera a este microorganismo psicrotrófico, aunque a 4 °C su crecimiento se vuelve más lento, presentando límites entre 1° y 45° C, y siendo su temperatura óptima de 30° a 37 °C. Para la destrucción de *L. monocytogenes* es necesario aplicar 70 °C durante 2 a 3 minutos.

Además de que se puede desarrollar en una escala de pH comprendida entre 6 y 8, siendo su pH óptimo de 7.5. Presenta valores límite que están entre 5 y 9, pasando estos límites se puede inhibir su crecimiento, sin embargo sobrevivirá. (Escartín, 2000), (Cabello, 2004) (Anderson & Pascual, 2000) (Jay, 2002)

2.3.1 Factores de patogenicidad

En la actualidad se admiten siete especies del género *Listeria*, siendo *L. monocytogenes* el patógeno de interés en los humanos ya que se han encontrado varios factores de patogenicidad en esta como una hemolisina que además es cardiotoxica, una lipolisina, un factor antifagocitario y un factor activador de maduración de monocitos; pero el factor de virulencia más importante relacionado con *L. monocytogenes* es la listeriolisina O (LLO). (Jay, 2002) (Cabello, 2004)

2.3.2 Invasión intracelular

Durante mecanismo de transmisión de listeriosis por la ruta oral *Listeria monocytogenes* coloniza el tracto intestinal, y es desde aquí que el microorganismo invade otros tejidos incluidos el torrente sanguíneo y la placenta en mujeres gestantes, siendo así se ha comprobado que las cepas que producen LLO son capaces de invadir determinados tejidos del organismos con la ayuda de una proteína extracelular p60 que está implicada en la penetración de *L. monocytogenes* a las células.

2.4. Listeriosis

La participación de *Listeria monocytogenes* como patógeno responsable de la listeriosis y por tanto de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA), resulta de la contaminación de estos por el microorganismo y que ocurre en uno o varios puntos de la cadena alimentaria a causa de las condiciones que favorecen el crecimiento del microorganismo, así como la falta de buenas prácticas ganaderas o de higiene dentro de los establos ya que se observa que la enfermedad comienza con la infección de los bovinos comportándose como una zoonosis, que sin el tratamiento adecuado éstos producirán leche contaminada. Además de la ausencia de programas de monitoreo dentro de la cadena alimentaria, con lo que al realizar subproductos que no conlleven un tratamiento térmico el microorganismo llegara hasta el consumidor final.

La listeriosis es una infección bacteriana que se produce en animales y humanos y es causada por *L. monocytogenes*. Actualmente se reconoce que la mayoría de casos de listeriosis humana es transmitida por alimentos, y a pesar de que esta enfermedad representa una fracción relativamente pequeña en comparación a otras enfermedades transmitidas por alimentos, implica un importante riesgo ya que representa el 3.8% de las hospitalizaciones por enfermedades transmitidas por alimentos y el 27.6% de las muertes causadas por enfermedades transmitidas por alimentos (Ryser & Marth, 2007)

Se considera que en un adulto puede originar infecciones gastrointestinales y uterinas. Sin embargo se ha observado que el riesgo de contraer la enfermedad aumenta en grupos definidos de alto riesgo. En personas inmunocomprometidas la infección se caracteriza por síntomas de septicemia, meningitis, endocarditis, abscesos, meningoencefalitis, neumonía, por mencionar algunos. En mujeres embarazadas puede desarrollarse amnioititis e infección del feto al que puede ocasionarle lesiones de tal magnitud que provoquen parto prematuro, óbito fetal e incluso aborto (Cabello, 2004) (Ryser & Marth, 2007)

2.5. Epidemiología

2.5.1 Incidencia

Por diversas razones el número real de casos de listeriosis que suceden en alguna determinada región no es exacto, sin embargo las cifras que se muestran dan una idea del riesgo que existe de contraer la infección.

2.5.2 Presencia en alimentos

Desde 1981, las investigaciones epidemiológicas han demostrado que el consumo de alimentos contaminados es el principal vehículo de transmisión de la listeriosis. Y en 1985 en California un brote de listeriosis con 142 casos fue atribuido a queso estilo mexicano con un índice de mortalidad del 33.8%, en donde la leche cruda utilizada para preparar el queso es la principal sospechosa del origen de la contaminación. (Jay, 2002) (Doyle *et al*, 2001)

De este modo el principal alimento que resulta objeto de estudio es la leche cruda, ya que una mala práctica higiénica dentro de los establos se puede traducir en la contaminación de la leche cruda y por tanto de los productos derivados de esta.

A la fecha los brotes más frecuentes se asocian con el consumo de queso fresco, queso de pasta blanda, y madurados, además de otros alimentos no lácteos como hortalizas crudas, y productos cárnicos elaborados como el paté y el salami.

2.5.3 Brotes asociados a quesos

A partir de la evidencia observada desde el brote de 1985 se hace notar que la causa más frecuente de contaminación del queso es la utilización de leche cruda para su producción. En la tabla 1 se muestran los brotes de listeriosis humana causados por el consumo de queso de los últimos años.

Tabla 1. *Brotes de listeriosis confirmada transmitida por queso.*

País	Año	Nº de casos	Nº de muertes	Serotipo
USA	2000-01	12	0	4b
Canadá	2002	27	0	NR
EUA	2003	13	1	4b
EUA	2006	3	1	4b
EUA	2012	22	4	NR
EUA	2013	6	1	NR
EUA	2014	5	1	NR
EUA	2015	30	3	NR
EUA	2017	8	2	NR

NR: No Reportado

Referencias: Callejo (2008), Castañeda *et al.*(2014), CDC (2017).

2.6. Queso

Se denomina queso al producto de la cuajada de la leche, por coagulación de la caseína. Y que resulta en la concentración de los principales componentes de la leche. Estos se pueden clasificar en madurados, frescos o fundidos.

Los quesos Frescos o quesos blandos estilo mexicano son quesos de pasta blanda que no requieren cocción, esta categoría comprende los quesos de leche entera, descremada y semidescremada, quesos de la crema y doble crema, requesón, y Panelas balcánicas. (Moreno, 2007) (Scott, 2003)

2.6.1 Elaboración Artesanal de Queso

La Elaboración de queso fresco comienza con la leche cruda a la que se añade cuajo en una concentración de 0.003%, cuando esta ha cuajado se procede a su corte, hasta formar pequeñas partículas en forma de cubo suspendidas en el suero que posteriormente se someten a un desuerado, después se añade sal de 2 a 3% y se introduce en moldes para ser prensados durante 24 horas para obtener el producto terminado.

De este modo resulta de importancia conocer el estado de los productos en los distintos puntos de la cadena alimentaria, llevando a cabo un seguimiento de estos. Siendo así se expone la importancia del estudio de trazabilidad.

2.7 Trazabilidad

De acuerdo con el *codex alimentarius* (en su 27^a sesión celebrada de 28 de junio a 3 de julio de 2004), la trazabilidad es la capacidad para seguir el movimiento de un alimento a través de diferentes etapas especificadas de producción, transformación y distribución.

En otras palabras, se refiere al rastreo o seguimiento de un producto o lote de productos a lo largo de la cadena alimentaria, lo cual permite conocer la evolución de estos y su trayectoria.

Además del seguimiento del producto se debe garantizar la inocuidad de los productos elaborados por lo que se hace necesario realizar una evaluación que determine la presencia de microorganismos patógenos como lo es *Listeria monocytogenes* por lo que existen distintos métodos y técnicas para su detección.

2.8. Métodos de detección de *Listeria monocytogenes*

2.8.1 Método microbiológico

Debido a los brotes de listeriosis asociados a alimentos, se han probado varios métodos para la detección microbiológica de *L. monocytogenes* y en consecuencia se implementó la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995, Bienes y Servicios. Método de Prueba Microbiológico Para Alimentos. Determinación de *Listeria monocytogenes*. Que establece la siguiente metodología:

Se toma una muestra representativa del alimento de 25 g en un recipiente conteniendo 225 mL de medio de enriquecimiento (EB), homogeneizar e incubar por 48 h a 30°C.

Después de 24 y 48 h de incubación en el medio EB, resembrar en medios LMP y OXA. Incubar las placas del medio LMP a 30°C por 24 a 48 h y las de medio OXA a 35°C por el mismo periodo. Observar el crecimiento en las placas del medio LMP. En este medio generalmente aparecen las colonias de color blanco o azul iridiscentes. En el medio OXA las colonias de *Listeria* son negras, con halo negro. Algunas colonias pueden aparecer con un tono café oscuro que se define mejor a los siete días de incubación.

Seleccionar las colonias típicas del medio de OXA o LMP y pasar a placas de medio ASTEL que podrán utilizarse como inóculo para realizar pruebas de identificación.

2.8.2 Prueba de movilidad

En Fresco

Hacer preparaciones en fresco (en gota suspendida o entre porta y cubreobjetos) utilizando solución salina al 0,85%. La suspensión debe ser densa y emulsificarse completamente, observar con objetivo de inmersión en un microscopio. Las células de *Listeria spp* son bacilos cortos con movilidad rotatoria. Los bacilos con movimientos rápidos no son *Listeria spp*.

En Agar

Inocular el medio SIM o MTM, incubar por 7 días a temperatura ambiente (20-25°C), observar diariamente. Las especies de *Listeria* son móviles, dando un crecimiento típico en forma de paraguas.

2.8.3 Prueba de hemólisis

Dibujar una cuadrícula de 20 a 25 espacios en el fondo de la placa de agar sangre de carnero al 5%. Inocular por picadura un cuadro por cada cultivo. Incubar por 48 h a 35°C. Al inocular, observar la reacción hemolítica en las placas con la producción de una zona ligeramente clara alrededor del punto de picadura. Confirmar las reacciones dudosas con la prueba de CAMP.

2.8.4 Prueba de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP)

Para llevar a cabo esta prueba se emplean distintas cepas de colección, como las que se pueden observar en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas de colección empleadas en la prueba de CAMP.

<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
ATCC 49444	
NCTC 7428	ATCC 6339
ATCC 25923	NCTC 1621
CIP 5710	

Referencia: Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1-1995.

En una placa de agar sangre de carnero sembrar una estría de la cepa de *S. aureus* y, paralelamente una de *R. equi*, separadas lo suficiente para que entre éstas se puedan estriar perpendicularmente las cepas sospechosas de *Listeria*, sin que lleguen a tocarse. Después de 24 y 48 h de incubación a 35°C observar el sinergismo entre las hemolisinas de *S. aureus*, *R. equi* y *Listeria* que se manifiesta como una zona hemolítica más intensa.

2.8.5 Serología

La determinación de los tipos serológicos de *Listeria* se aplica cuando las consideraciones epidemiológicas sean cruciales. Primero se inocula en caldo de triptosa por 24 h a 35°C. Para transferirse a dos tubos de agar inclinado de triptosa e incubar 24 h a 35°C. Para realizar la prueba se pueden utilizar sueros comerciales, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente se comparan los resultados obtenidos con el cuadro 8 presente en la norma NOM-143-SSA1-1995 y se determina el género y especie de las cepas aisladas. La correspondencia de resultados con el cuadro anterior indica la presencia del género *Listeria*.

2.8.6 Reacción en Cadena Polimerasa (PCR)

Esta técnica se basa en la identificación de microorganismos más que en su recuento. En donde una sola molécula de ADN de muestra podrá ser amplificado de tal forma que el producto obtenido se podrá visualizar en geles de agarosa. Por lo que los resultados se obtienen en un tiempo no mayor a 6 horas. De este modo la técnica de PCR presenta una gran eficacia para la detección de los microorganismos patógenos transmitidos por alimentos para los cuales no existen actualmente procedimientos más rápidos para su detección. (Jay, 2002)

2.8.6.1 Fundamento

La Reaccion en Cadena de la Polimerasa (PCR) es una técnica de amplificación enzimática “in vitro” de fragmentos de ADN (Arnaiz *et al*, 1995) la cual consiste en una síntesis enzimática, es decir una amplificación de hasta 10⁵ veces de un

segmento de ADN molde por medio de una Taq polimerasa dirigida por dicho molde y que se extiende a partir de dos iniciadores apropiados cebadores de ADN oligonucleotídicos monocatenarios específicos y antiparalelos hibridados al molde. La reacción se genera cuando se mezclan los reactivos antes mencionados y se someten a ciclos consecutivos de desnaturalización del ADN molde, permitiendo el alineamiento de los iniciadores donde se hibridaran a sus respectivas regiones complementarias del ADN molde, y la síntesis exponencial del producto de amplificación o extensión. (Castro, 2005) (Arnaiz *et al*, 1995)

2.8.6.1.1 Listeriolisina O

La Listeriolisina O (LLO) es una toxina activada por el tiol y es la responsable de la hemólisis- β , es decir la actividad lítica sobre los eritrocitos, la cual ha sido detectada en todas las cepas de *L. monocytogenes* incluso en algunas que no eran hemolíticas. El gen que codifica la producción de LLO es cromosómico y ha sido denominado *hly*. (Jay, 2002) (Doyle *et al*, 2001)

2.8.6.1.2 p60 e *iap*

Se ha probado que las cepa que producen LLO son capaces de invadir determinados tejidos del organismo, sin embargo esta LLO no interviene en la penetración de los fagocitos, de modo que la penetración es favorecida por una proteína extracelular distinta de 60 kDa denominada p60. Su gen fue llamado *iap* por las letras iniciales de las palabras que componen su denominación de proteína asociada con la invasión. (Doyle *et al*, 2001)

CAPITULO 3. METODOLOGÍA

3.1. Ubicación Espacio-temporal

El proyecto se realizó en el Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas CICM-ICUAP de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

3.1.1 Muestras

En la ciudad de Puebla están en funcionamiento con registro oficial 22 mercados, de los que se muestrearon 20 mercados, éstos fueron seleccionados a modo de que quedaran representadas todas las zonas de la ciudad haciendo el muestreo representativo con un intervalo de confianza del 95%; y precisión del 3%.

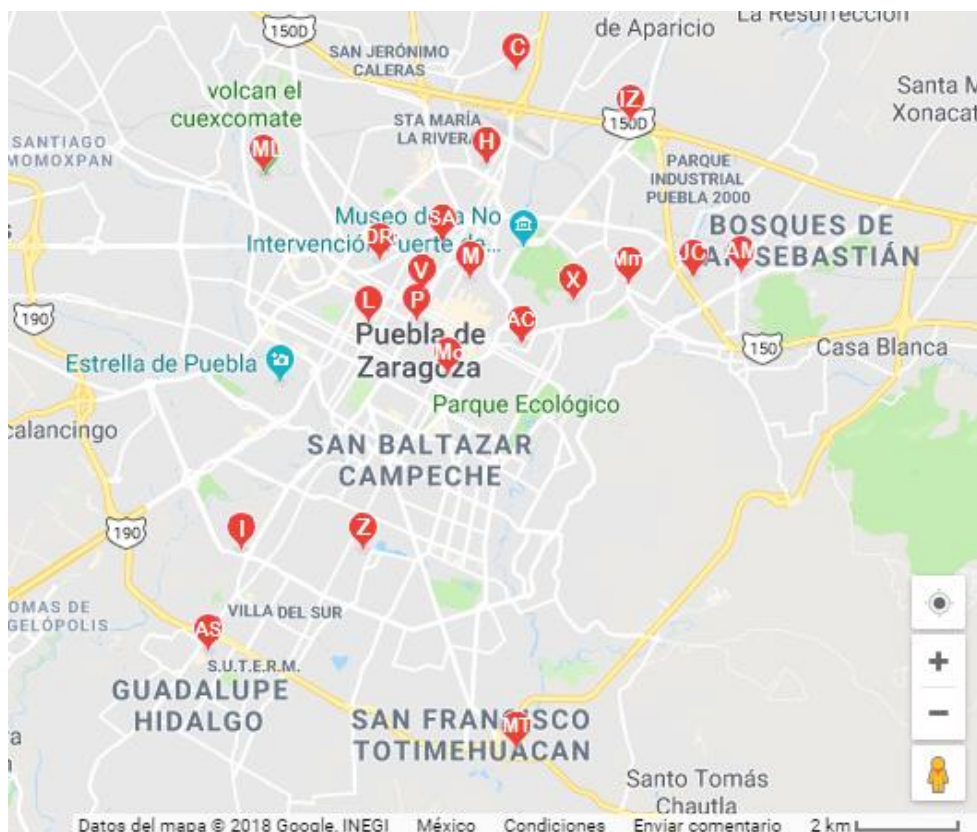


Figura 1. Mapa satelital donde se muestra la ubicación geográfica de los mercados de la ciudad de Puebla que fueron incluidos en el estudio. Fuente: INEGI.

3.1.2 Toma de Muestra

Se visitaron los mercados para determinar el número de expendios de quesos frescos no pasteurizados y se realizó una breve entrevista a los expendedores, sobre el tipo de quesos que vendían y su procedencia en caso de no ser productores, así como también el tipo de almacenaje al que sometían su producto en caso de no adquirirlo diariamente. Con esta información se determinó el número total de expendios y quesos que se analizaron de cada mercado. Además de que la información obtenida contribuyó a conocer la trazabilidad de los quesos analizados.

Posteriormente la toma de muestras así como su manejo y transporte hasta el laboratorio se llevó a cabo conforme a lo que se establece en la norma NOM-109-SSA1-1994. PROCEDIMIENTOS PARA TOMA, MANEJO Y TRANSPORTE DE MUESTRAS DE ALIMENTOS PARA SU ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO. Utilizando para ello bolsas individuales y estériles bien identificadas para cada queso. El transporte se realizó a temperatura de refrigeración y sin tiempos prolongados de traslado.

3.1.3 Análisis de las Muestras

Estando las muestras en el laboratorio se procedió de forma inmediata a realizar el análisis microbiológico para los indicadores de calidad y la búsqueda de *Listeria monocytogenes* en las muestras de queso obtenidas, lo cual se llevó a cabo como se muestra de forma general en la Figura 2.

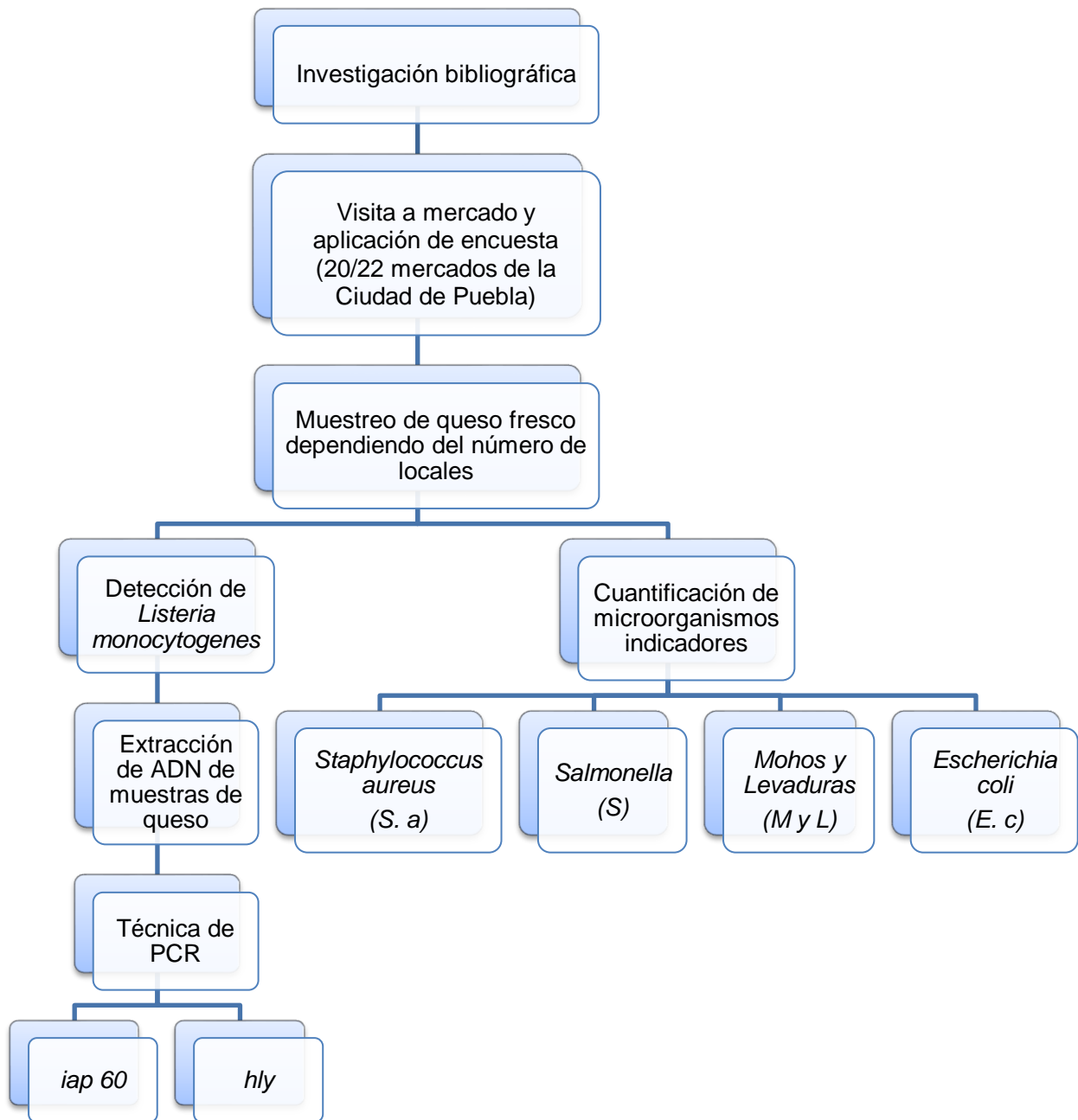


Figura 2. Esquema que muestra la metodología general de trabajo.

3.2. Estandarización de la técnica de PCR a partir de la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19111

3.2.1 Microorganismo empleado

Para llevar a cabo la estandarización de la PCR para la amplificación de los genes *iap* y *hly* se usó como cepa control a *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 que se obtuvo del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas ICUAP-BUAP.

3.2.2 Descongelación y aislamiento de la cepa tipo

La cepa de *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 se sometió a una descongelación lenta desde -70°C manteniéndola en hielo durante 30 minutos o hasta su completa descongelación. Una vez descongelada se sembró masivamente en placas de agar BRUCELLA-BUAP y estas fueron incubadas a 37°C, durante 24 horas.

3.2.3 Extracción de ADN a partir de la cepa tipo

Habiendo pasado las 24 horas de incubación se llevó a cabo la extracción de ADN, haciendo uso del kit Quick-gDNA MiniPrep, para lo cual se realizó una suspensión del cultivo bacteriano en 200 µL de agua estéril en un microtubo (Eppendorf) agitando perfectamente durante 5 minutos, dicha suspensión se transfirió a una columna de extracción contenida en tubo colector que sirvió como soporte y se centrifugó a 11000 rpm durante 1 minuto, y posteriormente se decantó el líquido del tubo colector. Se le añadió a la columna 200 µL de buffer de prelavado y nuevamente se centrifugó a 11000 rpm durante 1 minuto y se decantó el líquido. Posteriormente se le añadió a la columna 500 µL de buffer de lavado donde nuevamente se centrifugó a 11000 rpm durante 1 minuto y se decantó el líquido, finalmente se transfirió la columna de extracción a un microtubo (Eppendorf) nuevo y estéril, y se agregaron 50 µL de agua estéril, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm durante 45 segundos, con lo cual se obtuvo el ADN purificado de la cepa tipo.

3.2.4 Visualización del ADN por Electroforesis

Para poder observar los productos de la extracción fueron sometidos a una electroforesis mezclando 5 µL del ADN bacteriano obtenido con 2 µL de Loading buffer 6X para ADN (Invitrogen), que fueron depositados en pozos de gel de agarosa al 1% (p/v) y separados a 90 volts durante 60 minutos, en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8 ± 0.2), empleándose como marcador de tamaño molecular 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen). Dicho gel fue teñido en bromuro de etidio (5 µg/mL) durante 10 minutos para poder visualizar los amplicones en el transiluminador UV (Fotodyne Inc.).

3.2.5 Técnica de PCR para la identificación de *Listeria monocytogenes*.

Para la reacción de PCR se usaron por separado los iniciadores para oligonucleótidos que están basados en la secuencia del gen *iap 60* (Sentido: AAAAGCAACTATCGCGGCGGCTA, Antisentido: CAGCAGCAGCAACCTCATTA) y los que están basados en la secuencia del gen *hly* (Sentido: AGAAACACGCGGATGAAATC, Antisentido: TCGCTTTTACGAGAGCACCT).

El volumen total de la reacción fue de 25 µL, conteniendo 12.5 µL de Taq polimerasa, 0.1 µL del iniciador Sentido y 0.1 µL del iniciador Antisentido, 3 µL del ADN purificado de la cepa tipo y 9.3 µL de agua estéril para PCR.

Se empleó un termociclador (miniPCR™) con un programa que consta de una desnaturalización inicial del ADN molde a 94°C durante 4 minutos, seguido de 30 ciclos consecutivos que incluyen una desnaturalización a 94°C por un minuto, la alineación de los iniciadores a 52°C durante 1 minuto, y una extensión a 72°C durante un minuto, con un ciclo de extensión final a 72°C durante 5 minutos.

3.2.6 Visualización de los productos de PCR por Electroforesis

Los productos de PCR fueron visualizados por medio de una electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% (p/v), y separados a 90 volts durante 60 minutos, en tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8 ± 0.2), dicho gel se tiñó en bromuro de etidio (5 µg/ml) durante 10 minutos para poder visualizar y fotografiar

los amplicones en el transiluminador UV (Fotodyne Inc.). Como marcador de tamaño molecular se empleó 1 kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

3.3. Detección de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso fresco

Con las condiciones de reacción ya estandarizadas para la técnica de PCR a partir de la cepa tipo, se procedió a la detección de este microorganismo en las muestras de queso fresco como sigue.

3.3.1 Extracción de ADN a partir de las muestras de queso fresco

Se obtuvo ADN bacteriano a partir de las muestras de queso por medio de una suspensión de queso en caldo BRUCELLA-BUAP en relación 1:10 que posteriormente se incubó a 37°C durante 3 horas, pasado el tiempo se tomó una alícuota de 50 ml de la suspensión que se centrifugo a 1500 rpm durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante en un tubo cónico estéril que fue centrifugado a 7000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante obteniendo un pellet de células que fue sometido a una extracción haciendo uso del kit Quick-gDNA MiniPrep y su metodología antes descrita. Los productos fueron visualizados por electroforesis como se indica en el punto 2.4.

3.3.2 Técnica de PCR para la identificación de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso fresco

Para la reacción de PCR se procedió con el programa ya estandarizado como se indica en el punto 2.5, solo los volúmenes de reacción se modificaron, al contener 12.5 µL de Taq polimerasa, 0.1 µL del iniciador Sentido y 0.1 µL del iniciador Antisentido, 5 µL del ADN bacteriano que se extrajo de las muestras de queso y 7.3 µL de agua estéril para PCR, obteniendo un volumen total de reacción de 25 µL. Los productos de PCR fueron visualizados por electroforesis como se describe en el punto 2.6.

3.4. Análisis Microbiológico para Indicadores de Calidad

De acuerdo con las especificaciones microbiológicas de la 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. Para queso fresco se realizó la detección de: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, Mohos y levaduras como indicadores de calidad.

3.4.1 Preparación de la muestra

El procesamiento de la muestra se llevó a cabo de acuerdo con lo establece el Apéndice B en el apartado B.9.4.1.2 de la norma NOM-243-SSA1-2010.

En donde se pesaron de 10 g. de queso tomándolo de forma aleatoria y buscando su representatividad, estos fueron transferidos a un vaso de licuadora estéril, y al cual se adicionaron 90 mL del diluyente (agua peptonada), se operó la licuadora durante 1 minuto a velocidad máxima hasta obtener una suspensión homogénea. Después de esta suspensión fue transferido 1 mL en un tubo falcón que contenía 9 mL del diluyente. Se repitió el paso anterior hasta obtener el número de diluciones adecuadas.

3.4.2 Determinación de *Staphylococcus aureus*

La investigación y recuento de este grupo indicador se realizó de acuerdo a lo que establece la metodología del Apéndice B11 de la norma NOM-243-SSA1-2010.

Primero se depositaron 100 µL de cada dilución en placas de agar Baird-Parker, para distribuir el inóculo sobre la superficie del agar hasta que fue absorbido y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente se seleccionaron las colonias típicas para resembrar en caldo infusión cerebro corazón, y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Después se agregó al cultivo anterior 200 µL de plasma de conejo diluido en solución salina que se incubó en baño de agua a 37°C para observar durante 6 horas la posible formación de coágulo, si no se presentaba durante ese tiempo, se observaría hasta las 24 horas.

3.4.3 Determinación de *Salmonella*

De acuerdo a lo que establece la técnica del Apéndice B12 de la norma NOM-243-SSA1-2010; Primeramente se tomaron 25 g de la muestra de queso, que fueron transferidos a un vaso de licuadora estéril, y al cual se adicionaron 225 mL de medio de preenriquecimiento (agua de peptona tamponada) para licuar durante un minuto a velocidad máxima. La suspensión resultante fue incubada a 37°C por 24 horas. Después se transfirió 1 mL de la suspensión a tubos con 10 mL de medio de enriquecimiento (Caldo tetrionato) y se incubó a 37°C por 24 horas.

Posteriormente se sembró por estría en medios selectivos (Agar Xilosa Lisina Desoxicolato, Agar Verde Brillante, Agar Sulfito de Bismuto, Agar para *Salmonella* y *Shigella* y Agar McConkey), y se incubaron a 37°C por 24 horas Después se seleccionaron las colonias típicas de cada placa para inocular tubos de pruebas bioquímicas (Agar de tres Azúcares y Hierro, Agar de Hierro y Lisina, Agar MIO, Agar Citrato de Simmons, Caldo Rojo de Metilo-Voges Proskauer, y Caldo Urea), los cuales se incubaron a 37°C por 24 horas. Se observó el crecimiento en los tubos y se consultaron los resultados obtenidos en el cuadro 2 del apéndice B.12.4.6.2 para la presunta identificación de *Salmonella*.

3.4.4 Determinación de Mohos y Levaduras

La detección y recuento de este grupo indicador se llevó a cabo conforme al Apéndice B.17 de la norma NOM-243-SSA1-2010.

Se depositó por duplicado en cajas Petri 1 mL de cada una de las diluciones de muestra y se agregaron de 15 a 20 mL de agar papa dextrosa acidificado y fundido. Se mezcló bien el medio con el inóculo y se dejaron reposar las cajas para permitir que la mezcla gelificara. Una vez gelificado el medio se incubaron a 25°C. Se contaron las colonias de cada placa a los 3, 4 y 5 días de incubación. Si después de 5 días alguna parte de la caja mostró crecimiento extendido de mohos o si resultó difícil contar colonias bien aisladas, se consideraron los conteos de 4 o 3 días de incubación.

3.4.5 Determinación de *Escherichia coli*

La estimación de la Densidad Microbiana de este grupo indicador se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita en el apéndice normativo B.18 de la norma NOM-243-SSA1-2010.

Para la prueba presuntiva se transfirió 1 mL de cada dilución de la muestra por triplicado a tubos con medio de enriquecimiento selectivo (Caldo lauril sulfato triptosa). Dichos tubos se incubaron a 37°C por 24 horas y se observó la formación de gas y turbidez del medio en los tubos positivos, prolongando el tiempo de incubación hasta por 48 horas en caso de no observarse la formación de gas y turbidez del medio.

Para la prueba confirmativa, se tomaron 200 µL de cada tubo positivo para sembrarlos en un número igual de tubos con medio de confirmación (Caldo *E. coli*) y fueron incubados a 44°C por 24 horas, tiempo que se prolongaría hasta por 48 horas si no había formación de gas. Por último se realizó el conteo de tubos de la prueba confirmativa positivos para buscar el NMP en las tablas correspondientes del apéndice B.18.

CAPITULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.1 Muestras

De los 22 mercados registrados en la ciudad de Puebla, se muestrearon en total 20 mercados, obteniéndose un total de 126 quesos frescos no pasteurizados de leche de vaca, provenientes de diferentes lugares, destacan los de Chipilo de donde se obtuvieron 23 muestras (18.2%), Tlaxcala con 19 muestras (15%) y Santa María Tonanzintla con 14 muestras (11.1%), entre otros como se muestra en la Figura 3.

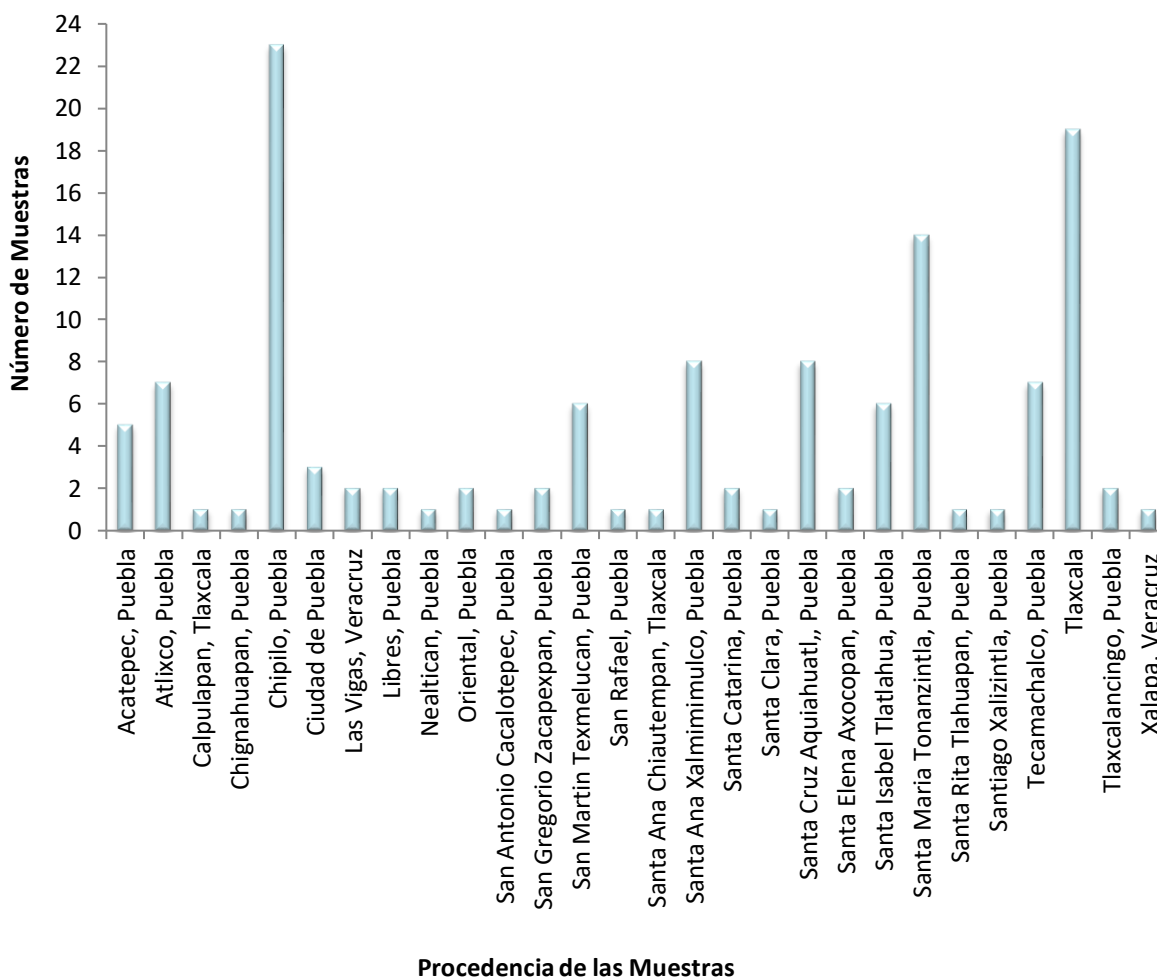


Figura 3. Gráfico que muestra el número de quesos frescos no pasteurizados analizados por lugar de procedencia

Las muestras que se obtuvieron de estos mercados fueron transportadas en cadena de frío hasta el laboratorio del CICM-ICUAP-BUAP conforme a lo que establece la NOM-109-SSA1-1994 mencionada en el punto 3.1.2 del capítulo 3, realizando su análisis en un tiempo no mayor a 2 horas.

Como se puede observar en el gráfico de la Figura 3 existe una gran cantidad de productores que elaboran queso fresco de forma artesanal, observándose 28 lugares de procedencia para las muestras analizadas. De las cuales se encontró contaminación con *Listeria monocytogenes* en muestras de los dos lugares de procedencia con mayor número de quesos frescos obtenidos (Chipilo y Tlaxcala).

4.1.2. Estandarización de la técnica de PCR a partir de la cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19111

El primer paso para la determinación de *Listeria monocytogenes* por medio de la técnica de PCR consistió en la extracción de ADN bacteriano de la cepa tipo ATCC 19111 durante la estandarización de la técnica, y posteriormente de las muestras de queso fresco, lo cual se realizó siguiendo las instrucciones del kit gDNA MiniPrep, no fue necesario hacer ajustes o el uso de algún otro implemento. Y para lo cual se obtuvieron los resultados esperados al visualizar las bandas correspondientes, (Figura 4).

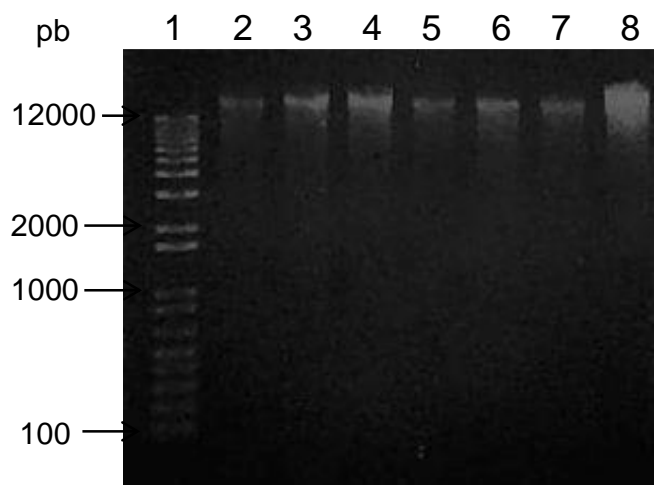


Figura 4. Gel de agarosa donde se muestran los resultados para la extracción de ADN bacteriano
1) Marcador de tamaño molecular, 2-8) ADN de *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

Después de visualizar los resultados de la extracción y corroborar la obtención de ADN bacteriano, se llevó a cabo la técnica de PCR de punto final para la cepa tipo de *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, en donde se obtuvo para el gen *iap 60* un amplicón de 234 pb y para el gen *hly* un amplicón de 237 pb, como muestra la Figura 5. De tal modo que quedaron estandarizadas las condiciones de reacción para la posterior búsqueda del patógeno en las muestras de queso.

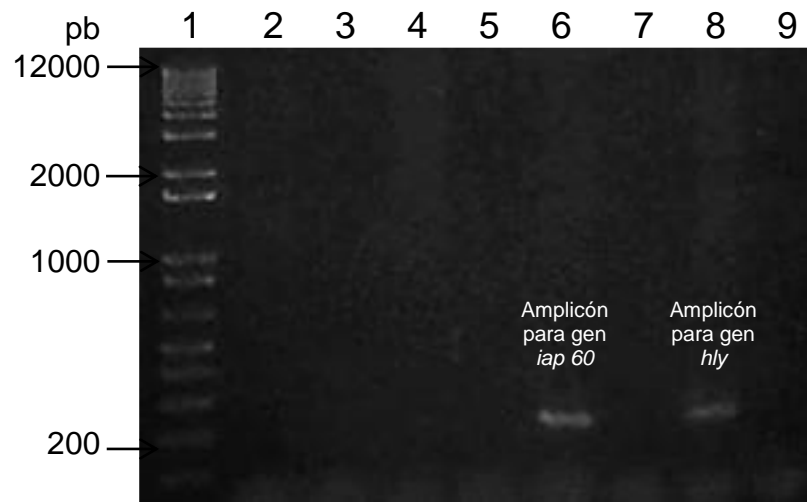


Figura 5. Gel de agarosa donde se muestran los amplicones para los genes *iap 60* y *hly* de *L. monocytogenes*, 1) Marcador de tamaño molecular, 2-5) Amplicones negativos, 6) Control positivo para el gen *iap 60*, 7) Control negativo, 8) Control positivo para el gen *hly*, 9) Control negativo.

Adicionalmente se enviaron a secuenciar dos amplicones positivos de la cepa tipo para confirmar la identificación de *Listeria monocytogenes* por medio de la técnica de PCR, obteniendo los siguientes resultados:

- Secuencia genómica de la cepa tipo de *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 usando el iniciador para oligonucleótido que codifica para el gen *iap 60* (182 pb)
>CPLAP: AATCGCATCCGCAAGCACTGTAGTAGTCGAAGCTGGGTTGAATT
AACTCTCTTGTGGGGTATCGCACAAAGTAAAGGGACTACTGTTGACGCAAT
TAAAAAAGCAAACAATTTAACAACAGATAAAATCGTACCAGGTCAAAAATTA
CAAGTAAATAATGAGGTAGACTAGACATGCTGAAG

- Secuencia genómica de la cepa tipo de *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 usando el iniciador para oligonucleótido que codifica para el gen *hly* (206 pb)
>CPLIS: ATTACAATAAAAACAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGA
CAAATGTGCCGCCAAGAAAGGTTAACCAAAGATGGAAATGAATATATTGTT
GTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAATAATGCAGACATTCAAGTT
GTGAATGCAATCCTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTACATCGATAAAAGC
GAGACTAA

Estas secuencias se sometieron a un análisis en la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) obteniendo un valor E menor a 1 y una identidad del 96% como muestra la Figura 6.

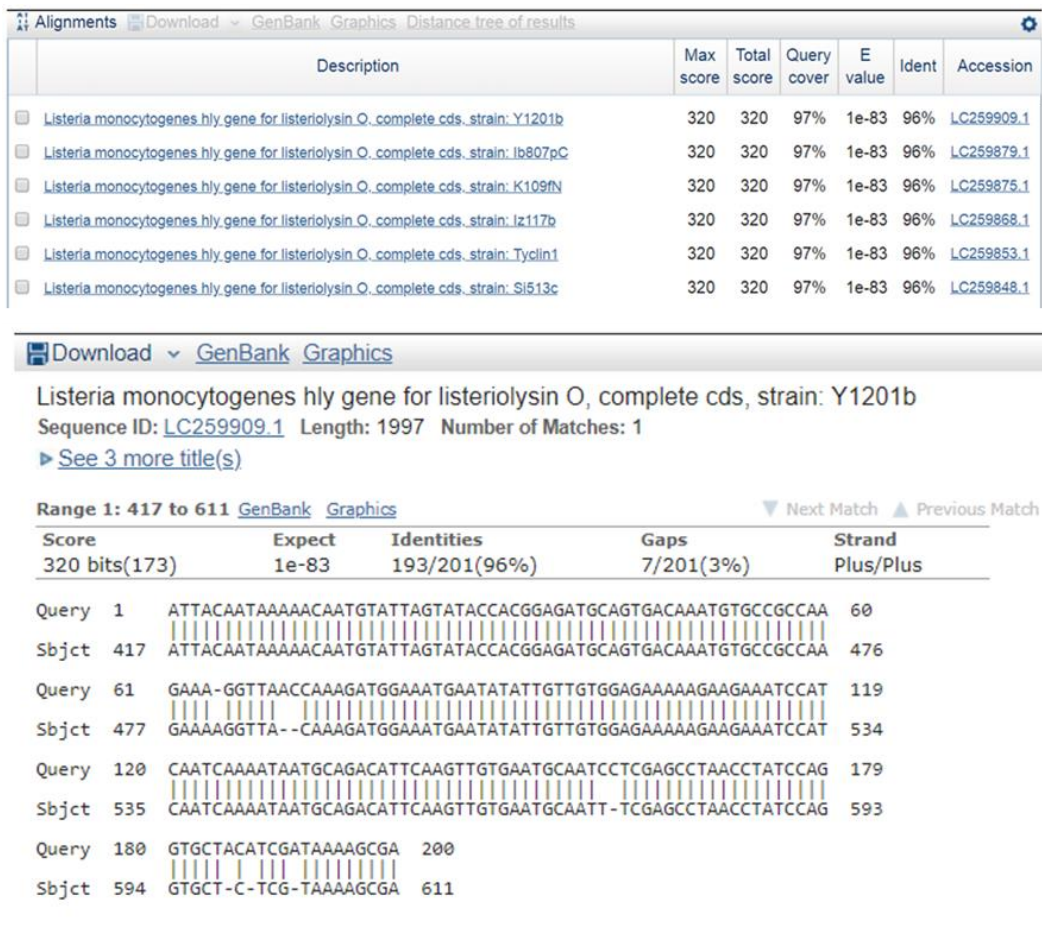


Figura 6. BLAST de la secuencia correspondiente a la cepa tipo con el iniciador para oligonucleótido que codifica para el gen *hly*.

Mientras que algunos autores utilizan la secuenciación de nucleótidos para la determinación de microbiota como es el caso de Escobar-Zepeda *et al.*, quienes mediante el uso de una secuenciación de metagenoma completo realizaron un análisis del microbioma de queso Cotija, en esta investigación la secuencia genómica de los amplicones positivos de las muestras en las que se identificó a *L. monocytogenes* se sometió a un análisis en la base de datos BLAST para verificar la similitud de las secuencias nucleotídicas depositadas en esta base de datos contra las obtenidas. Y de esta forma corroborar la identificación de *Listeria monocytogenes* por medio de la técnica de PCR.

Por lo tanto, al final de un plazo aproximado de 6 meses quedaron estandarizadas las condiciones de la técnica de PCR para la búsqueda de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos, las cuales se muestran resumidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Variables estandarizadas para la Técnica de PCR.

	Variables	Condiciones
Iniciadores para oligonucleótido	Secuencia basada en el gen <i>iap 60</i>	S: AAAAGCAACTATCGCGGCGGCTA A: CAGCAGCAGCAACCTCATTA
	Secuencia basada en el gen <i>hly</i>	S: AGAAACACGCGGATGAAATC A: TCGCTTTTACGAGAGCACCT
Programa	Temperatura	Desnaturalización: 94°
		Alineamiento: 52°
		Extensión: 72°
	Tiempo	Desnaturalización: 4 min / 1 min
Alineamiento: 1 min		
Extensión: 1 min / 5 min		
	Ciclos	30
Volúmenes de reacción	Iniciadores para oligonucleótido	0.1 µL
	ADN de la cepa tipo	3.0 µL
	ADN bacteriano de las muestras de queso	5.0 µL

4.1.3. Detección de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso fresco

Una vez estandarizadas las condiciones de reacción para la técnica de PCR se realizó el análisis de las muestras de queso fresco, de manera que se identificó la presencia *Listeria monocytogenes* en dichas muestras. Las Figuras 7 y 8 presentan geles de agarosa en los que se observaron las bandas de amplificación correspondientes con el tamaño de amplicón de la cepa tipo de *L. monocytogenes*.

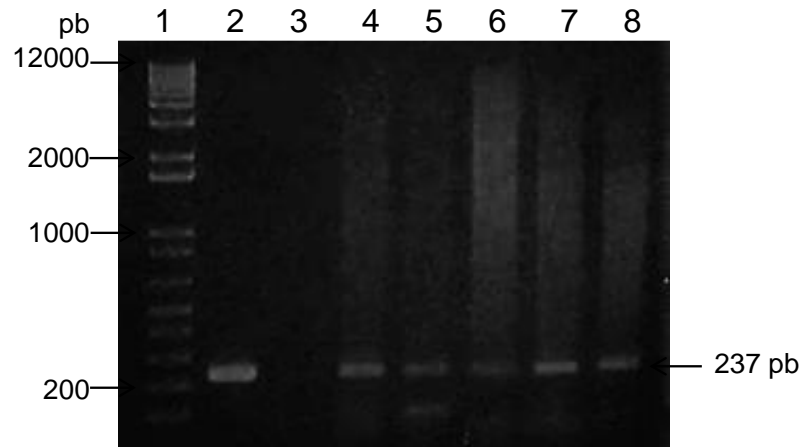


Figura 7. Gel de agarosa donde se muestran los amplicones de las muestras de queso para el gen *hly* de *L. monocytogenes*, provenientes del mercado "I" 1) Marcador de tamaño molecular, 2) Control positivo, 3) Control negativo 4-8), Amplicones de muestras positivos.

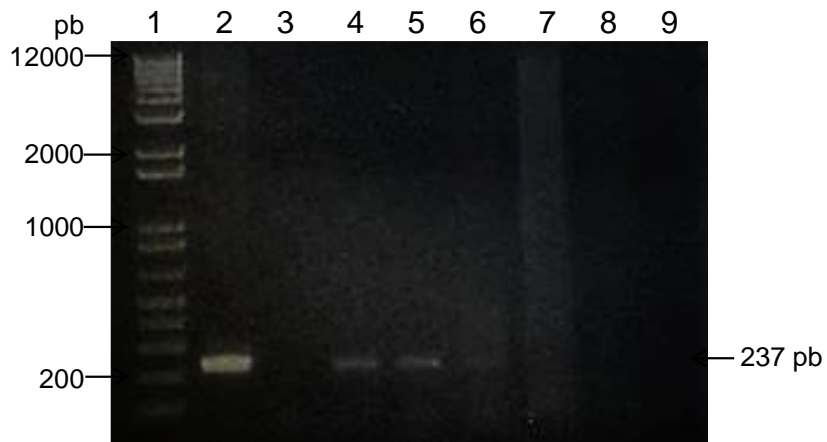


Figura 8. Gel de agarosa donde se muestran los amplicones de las muestras de queso para el gen *hly* de *L. monocytogenes*, provenientes del mercado "C" 1) Marcador de tamaño molecular, 2) Control positivo, 3) Control negativo 4-6), Amplicones de muestras positivos 7-9) Amplicones de muestras negativos.

De tal manera que se logró identificar a *Listeria monocytogenes* en un total de 12 muestras que representan el 9.5% del total de quesos analizados como se observa en la Figura 9.

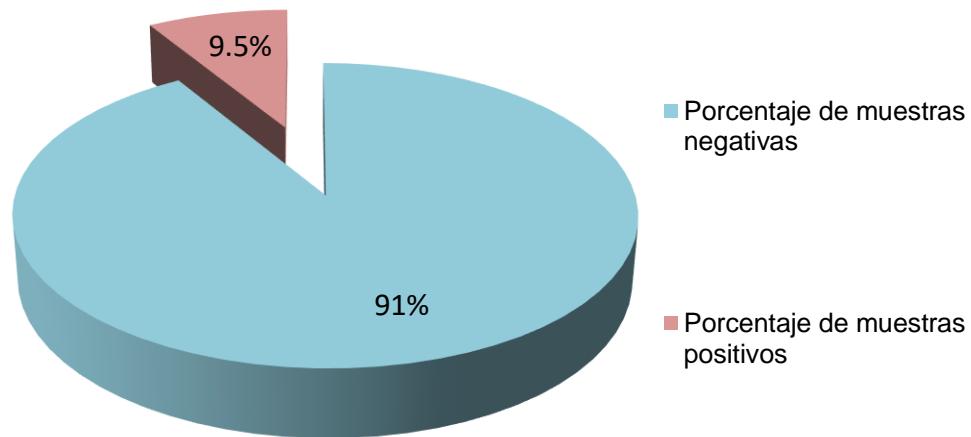


Figura 9. Gráfico de porcentaje de quesos frescos no pasteurizados que dieron resultados positivos para la detección de *Listeria monocytogenes*.

Por consiguiente como presenta la Figura 9, se observó una incidencia de *Listeria monocytogenes* del 9.5% lo que concuerda con los datos obtenidos por Soto *et al.*, quienes reportan una incidencia del 9.3% en un estudio similar llevado a cabo en Sinaloa, con 75 muestras obtenidas de mercados minoristas. A pesar de que se considere baja la incidencia de *L. monocytogenes* que se muestra en esta investigación, su identificación no deja de representar un gran riesgo para la salud pública al estar presente en un alimento listo para consumir.

Además dichos quesos provenían de 4 mercados diferentes (16%) de los 20 mercados muestreados como se presenta en la Figura 10.

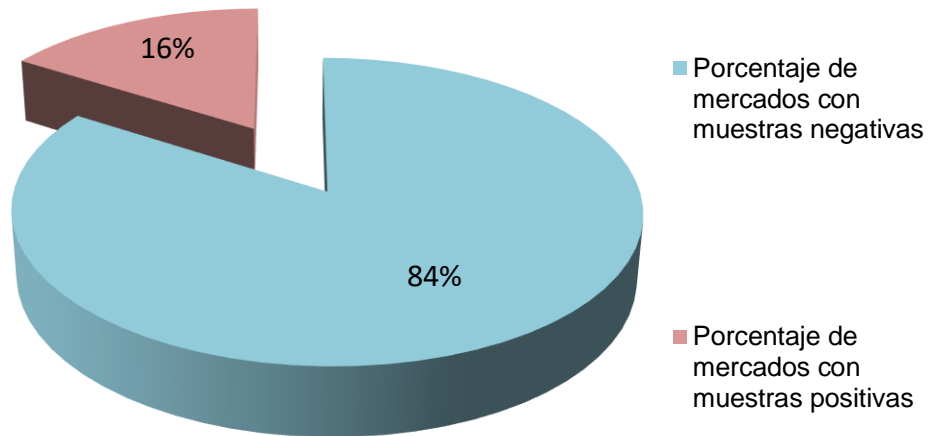


Figura 10. Gráfico del porcentaje de mercados en los que las muestras de quesos frescos no pasteurizados dieron resultados positivos para la detección de *Listeria monocytogenes*.

De igual forma, el porcentaje de mercados (16%) en los que se encontraron muestras contaminadas expresado en la Figura 10, demuestra la necesidad de implementar medidas sanitarias que garanticen la inocuidad de los productos que llegan hasta el consumidor.

Cabe mencionar que en la ciudad de Puebla no se tienen antecedentes de estudios para la búsqueda de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos provenientes de mercados, de modo tal que esta investigación es la primera en dar a conocer la situación real de la calidad higienicosanitaria de estos productos dentro de la ciudad. Además de proponer la técnica de PCR para su búsqueda, que presenta mayores ventajas que el método microbiológico tradicional.

Aparte al igual que con los amplicones positivos para la cepa tipo, se enviaron a secuenciar dos amplicones positivos de una de las muestras de queso, obteniendo los siguientes resultados:

- Secuencia genómica de las muestras de queso en las que se identificó a *Listeria monocytogenes* usando el iniciador para oligonucleótido que codifica para el gen *iap 60* (597 pb)

```
>QULAP: CAGAGCAAGGGTGGCGATTATGAGTGACCATGGACCTTGCTCG
AAAGATCGTAAACTATCTGGTCAGTGTCGCAGCCAAAGTAAGCACGACATA
GGGTCACCGTTGAACNTCTGGCGAGTAACANCTCCNCTACTGGGTTTGAGC
GATTCAGCCTAGTCCACANTGTGGGANTAGTGCGTTGCAATNGCTGTCCA
TNCGACGNAGTGCANTGAGCCACNGNGAGTANCNTCAGCTGTGNTAAC
GTAGCGGACTAGAGTGTAACACACAATATGGCTACAAATGAGATTCGTGC
ACGGNCTACGATCTGTGGTACTAGGTGGCAAATACTGNCANTGATGAAAT
GCCNCGTATTAAGGGTNACNCTGTAGGGACAAATTGAGGGACCCTGAGG
GGAACGCCAAAAAAATGTGGATTGAAACGAAAACATGGTTAAAGGAGGG
CCTTAAGGAAACCCGGGTGGATTTACTCAGGGTCCCGTGNTGNCCGCCAT
GCGGACCGNTGNAGGGCAAATTAAGGTTGGTGCCCGNTCNCCGNATGT
TGAAAAAAGAAGTCGATNGCTCGTAGAGTTGGGTGAAGAAGAGNGGTGC
AGGGAT
```

- Secuencia genómica de las muestras de queso en las que se identificó a *Listeria monocytogenes* usando el iniciador para oligonucleótido que codifica para el gen *hly* (201 pb)

```
>QULIS: ATTACAATAAAAACAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGA
CAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAGATGGAAATGAATATATTGTTG
TGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAATAATGCAGACATTCAAGTTG
TGAATGCAATTTTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAGA
CAA
```

Estas secuencias se sometieron a un análisis en la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) como muestra la Figura 11.

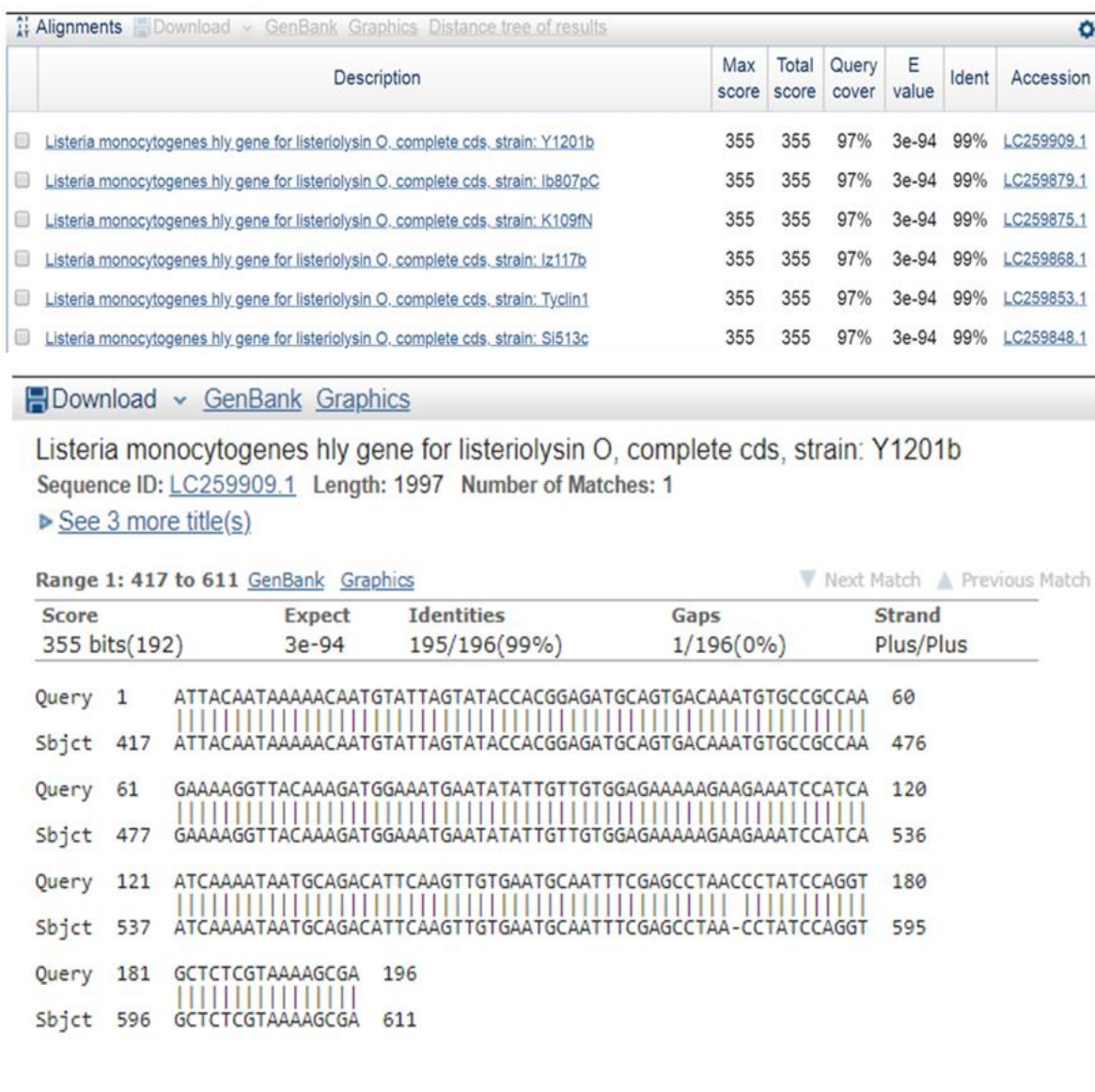


Figura 11. BLAST de la secuencia correspondiente a la muestra de queso con el iniciador para oligonucleótido que codifica para el gen *hly*.

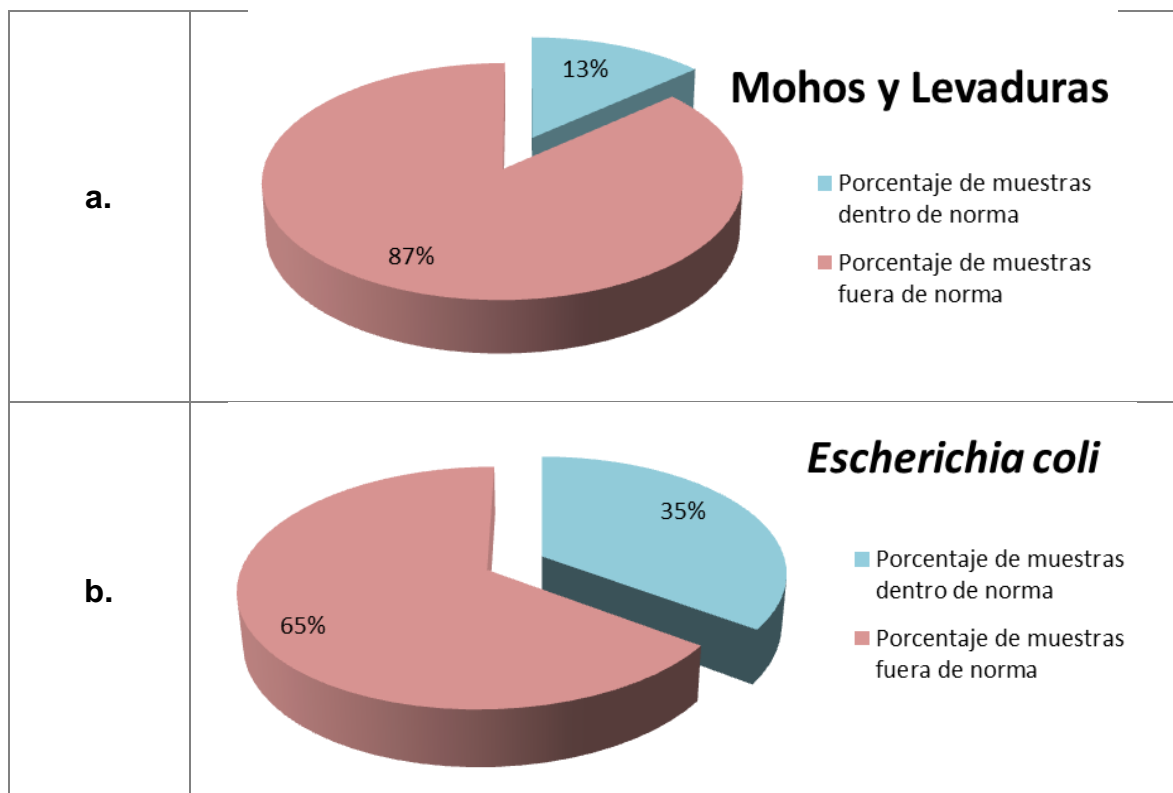
Al verificar la similitud de las secuencias nucleotídicas depositadas en la base de datos BLAST contra las obtenidas, se obtuvo un valor E de $3e^{-94}$ y un 99% de identidad, de manera que se pudo confirmar que el microorganismo identificado en las muestras fue *L. monocytogenes* validando de este modo la técnica propuesta.

4.1.4. Análisis Microbiológico para Indicadores de Calidad

Por otra parte se realizó la cuantificación de los indicadores de calidad microbiológica en los quesos frescos no pasteurizados analizados, para lo cual los resultados indicaron la presencia de valores que exceden el límite máximo permisible de contenido microbiano establecido por la norma NOM-243-SSA1-2010.

De este modo los gráficos de la Figura 12 indican el porcentaje de muestras que incumplen las especificaciones de la norma para cada indicador de calidad microbiológica del total muestras analizadas. En la cual se puede observar que de este total, el 87% de muestras superan el límite máximo permisible de contenido de Mohos y Levaduras que establece la norma NOM-243-SSA1-2010 siendo el indicador con la mayor incidencia, seguida de *E. coli* con el 65%.

Por el contrario el índice más bajo de incumplimiento se presenta para *Salmonella* con el 4% de presencia en las muestras de queso fresco.



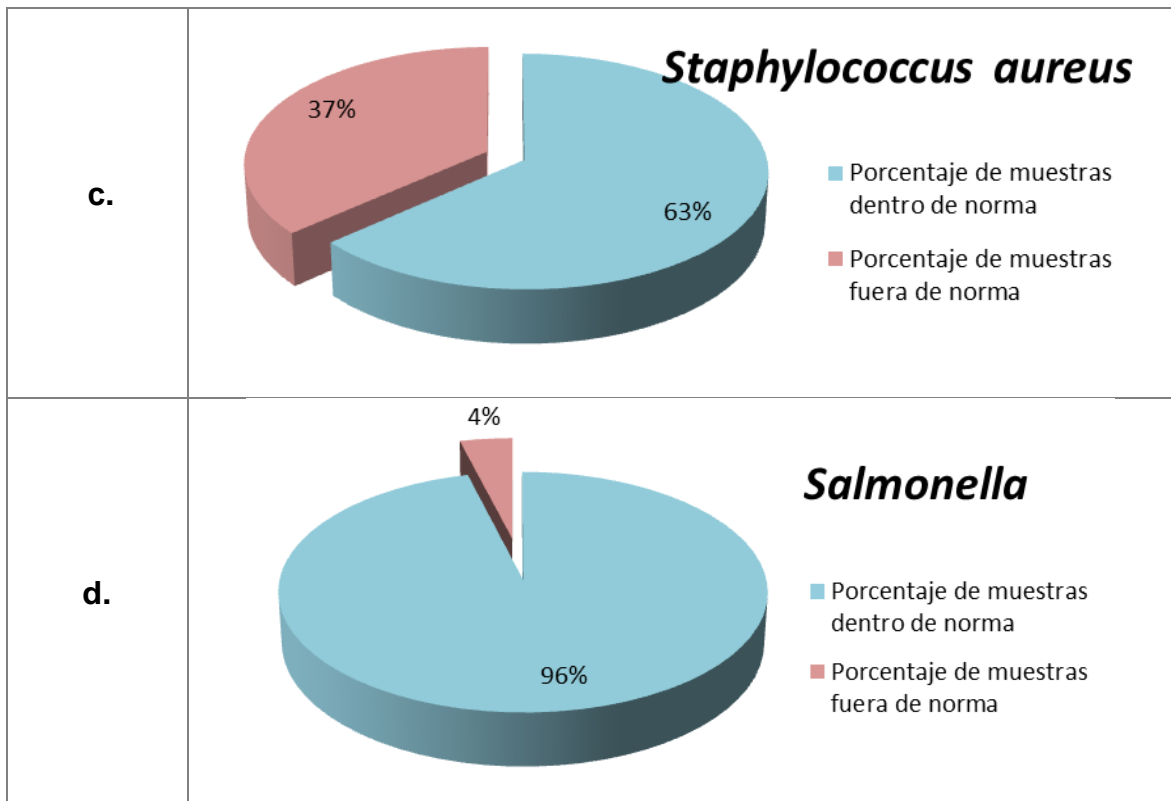


Figura 12. Gráficos indican el porcentaje de muestras de cada indicador de calidad microbiológica que incumplen las especificaciones de la norma NOM-243-SSA1-2010.

Los indicadores presentes en las muestras manifiestan que el mayor porcentaje de incumplimiento de la norma son los Mohos y Levaduras con el 87% del total de muestras como se observa en el inciso a. de la Figura 12, lo que resulta preocupante ya que un alto contenido de mohos nos indica malas prácticas de higiene, puesto que expone la deficiente limpieza tanto del ambiente como de equipos y utensilios en el área de trabajo. Sin embargo, para el caso de las Levaduras, a pesar de ser elevado el porcentaje obtenido, no supera el reportado por Castro-Castillo *et al.*, quienes establecen que las levaduras fueron el grupo microbiano predominante durante el análisis y muestran un porcentaje superior (100%) al reportar que todos los valores microbianos superan ampliamente el límite establecido por la norma NOM-243-SSA1-2010. Además mencionan que es más común la prevalencia de levaduras en quesos artesanales madurados o con

periodos prolongados de refrigeración. Lo que resulta interesante al examinar el alto contenido de este grupo microbiano en las muestras analizadas.

El promedio de carga microbiana de *E. coli* que obtuvo Silva *et al.* para muestras de queso artesanal en los tianguis de Tochtepec, Tecamachalco y Acatzingo, Puebla supera el límite establecido por la NOM-243-SSA1-201 al igual que algunos quesos frescos provenientes de Tuzupán, Tecamachalco, Puebla como reporta Reséndiz *et al.* estos datos concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, ya que de igual forma se observó una elevada carga microbiana superando el valor máximo permisible de esta norma. Estos resultados se muestran alarmantes ya que la contaminación de los productos con este microorganismo refleja una contaminación fecal conduciendo al posible desarrollo de algunas enfermedades gastrointestinales.

La cantidad de muestras que superan los límites de *S. aureus* no es muy elevada como demuestra el inciso c. de la Figura 12, sin embargo aún existe riesgo de que se encuentren presentes enterotoxinas estafilocócicas, que pueden conducir a una intoxicación alimentaria. Castro-Castillo *et al.*, muestran valores superiores a los que se obtuvieron en esta investigación, sin embargo manifiestan que la presencia de este indicador de calidad demuestra serias fallas en las condiciones higiénicosanitarias de las queserías.

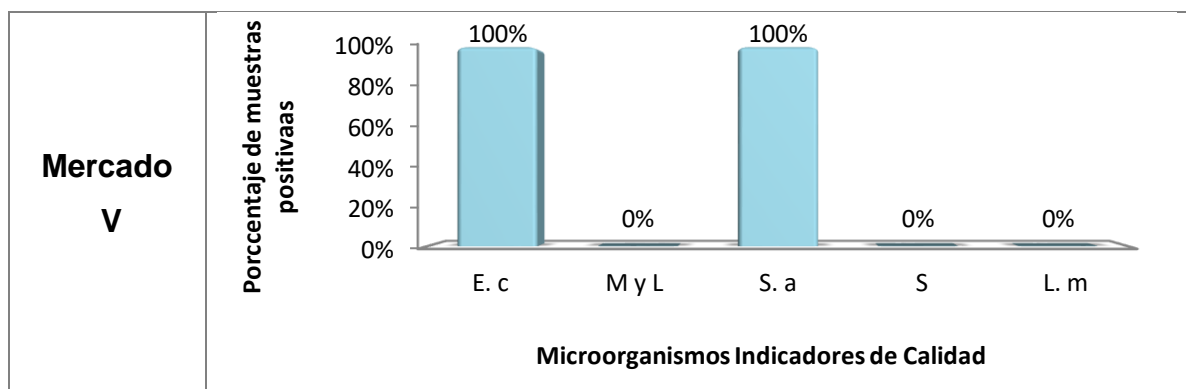
La incidencia de *Salmonella* en las muestras analizadas resultó sumamente baja (4%), en comparación con los datos que presenta Gonzales- Montiel *et al.*, en un estudio que determinó la microbiota del queso de Aro en el municipio de Teotitlán de Flores Magón, Oaxaca, ya que identificaron colonias típicas de *Salmonella* en el 100% de las muestras que analizaron, no obstante hay que tener presente el riesgo que exhibe la identificación de este patógeno en un producto listo para consumir además de los padecimientos que esta enfermedad conlleva. Ya que en algunos otros estudios como el realizado por Soto *et al.*, con muestras obtenidas de mercados minoristas en Sinaloa, México, no detectaron la presencia de este

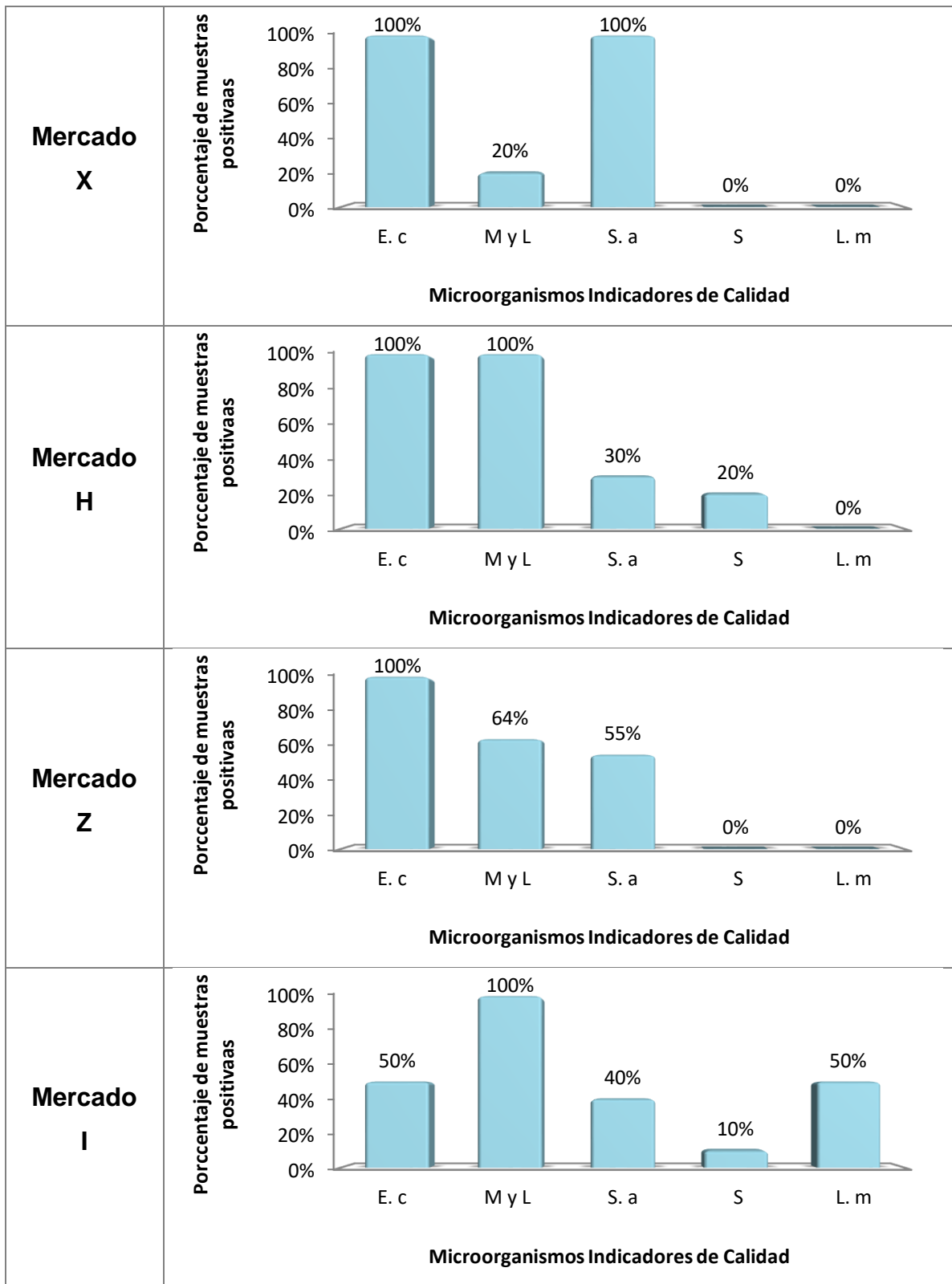
patógeno en ninguna de las muestras analizadas. De igual forma durante una caracterización microbiológica de quesos artesanales de granja fabricados en Escocia, Williams y Withers no detectaron incidencia de *Salmonella* en las muestras analizadas. Los cuales muestran que si es posible obtener una calidad microbiológica superior para los mismos productos.

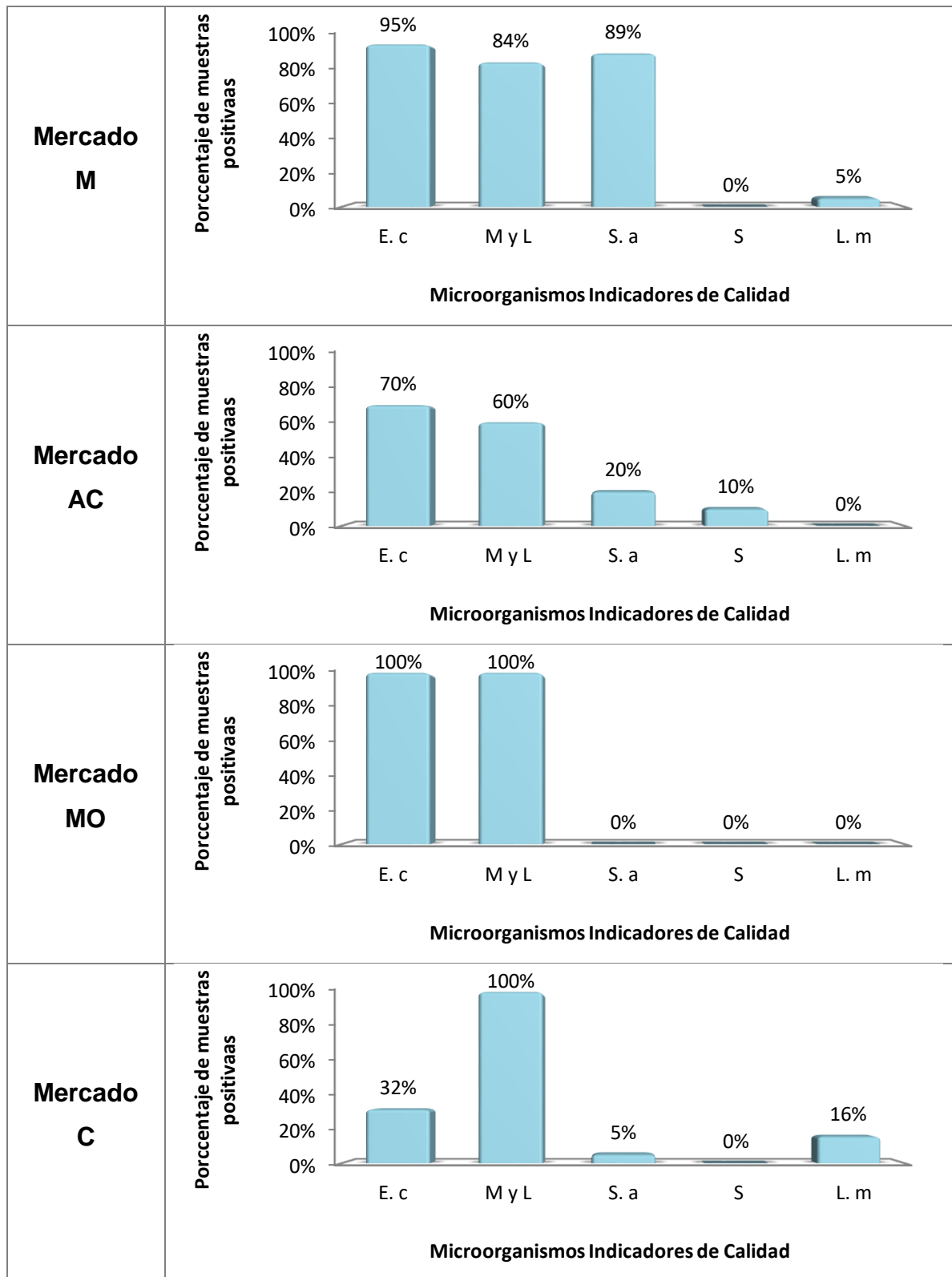
Otro aspecto importante es el incumplimiento individual que expone cada mercado, por lo que la Figura 13 presenta los gráficos que expresan el porcentaje de muestras para cada mercado que exceden los valores máximos permisibles establecidos por la norma NOM-243-SSA1-2010 de cada indicador de calidad microbiológica.

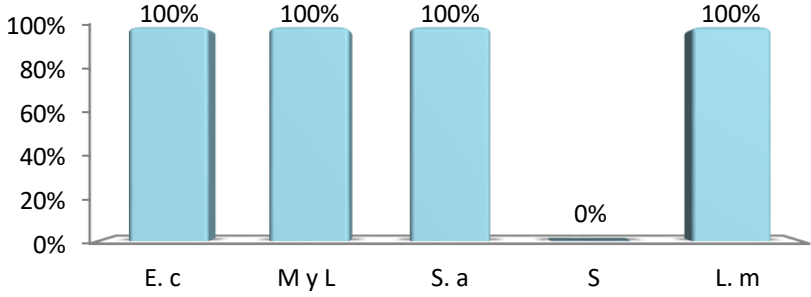
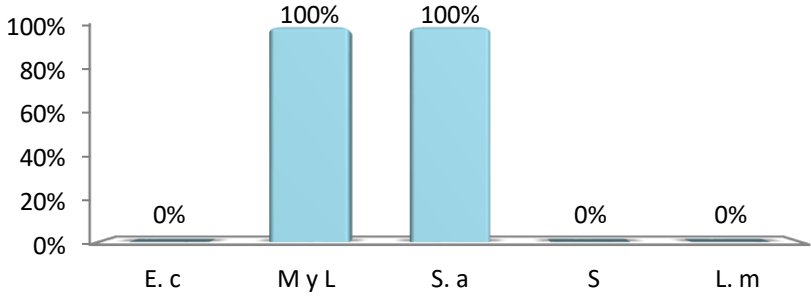
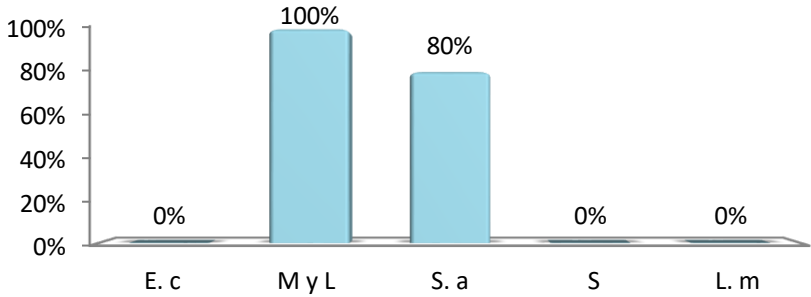
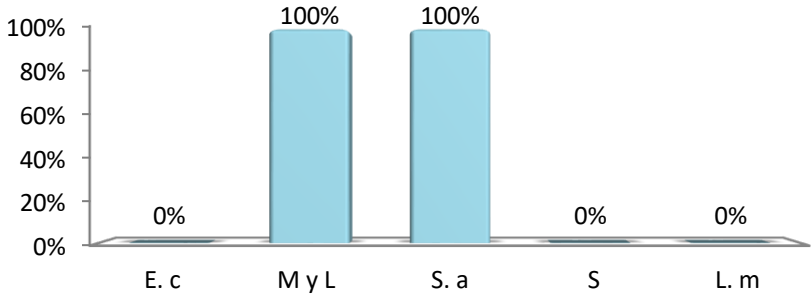
También puede observar en la Figura 13 que el mercado con el código “AM” es el que mayor contaminación presenta y de mayor riesgo, ya que del total de muestras analizadas para dicho mercado, el 100% de estas excedieron el límite máximo permisible de la norma NOM-243-SSA1-2010 para *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Mohos* y *Levaduras*, y *Listeria monocytogenes*. Siendo *Salmonella* el único microorganismo que no se identificó y que por lo tanto cumplió con los requerimientos de la norma.

Por el contrario el Mercado con código “MT” es el que presenta menor porcentaje de incumplimiento de la normatividad ya que del total de muestras analizadas para este mercado el valor más alto lo presentan los Mohos y Levaduras con un 80% de incumplimiento y en el cual no se determinó la presencia de patógenos.

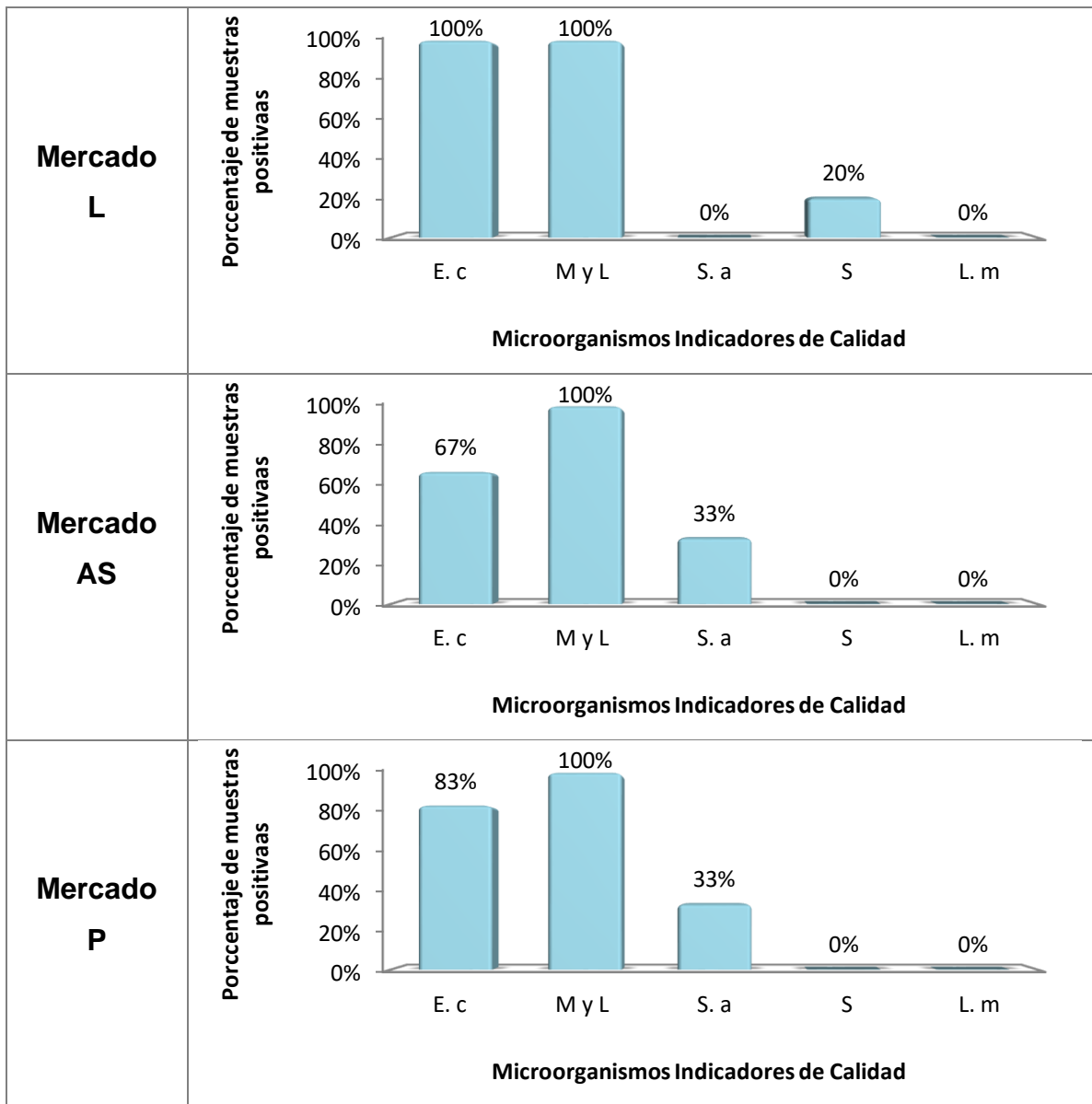






<p>Mercado AM</p>	<p>Porcentaje de muestras positivas</p>  <p>Microorganismos Indicadores de Calidad</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Microorganismo</th> <th>Porcentaje de Muestras Positivas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E. coli</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>M y L</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S. a</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>L. m</td> <td>100%</td> </tr> </tbody> </table>	Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas	E. coli	100%	M y L	100%	S. a	100%	S	0%	L. m	100%
Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas												
E. coli	100%												
M y L	100%												
S. a	100%												
S	0%												
L. m	100%												
<p>Mercado ML</p>	<p>Porcentaje de muestras positivas</p>  <p>Microorganismos Indicadores de Calidad</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Microorganismo</th> <th>Porcentaje de Muestras Positivas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E. coli</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>M y L</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S. a</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>L. m</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>	Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas	E. coli	0%	M y L	100%	S. a	100%	S	0%	L. m	0%
Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas												
E. coli	0%												
M y L	100%												
S. a	100%												
S	0%												
L. m	0%												
<p>Mercado MM</p>	<p>Porcentaje de muestras positivas</p>  <p>Microorganismos Indicadores de Calidad</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Microorganismo</th> <th>Porcentaje de Muestras Positivas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E. coli</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>M y L</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S. a</td> <td>80%</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>L. m</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>	Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas	E. coli	0%	M y L	100%	S. a	80%	S	0%	L. m	0%
Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas												
E. coli	0%												
M y L	100%												
S. a	80%												
S	0%												
L. m	0%												
<p>Mercado SA</p>	<p>Porcentaje de muestras positivas</p>  <p>Microorganismos Indicadores de Calidad</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Microorganismo</th> <th>Porcentaje de Muestras Positivas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E. coli</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>M y L</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S. a</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>L. m</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>	Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas	E. coli	0%	M y L	100%	S. a	100%	S	0%	L. m	0%
Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas												
E. coli	0%												
M y L	100%												
S. a	100%												
S	0%												
L. m	0%												

<p>Mercado DR</p>	<p>Porcentaje de muestras positivas</p> <p>Microorganismos Indicadores de Calidad</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Microorganismo</th> <th>Porcentaje de Muestras Positivas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E. c</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>M y L</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S. a</td> <td>75%</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>L. m</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>	Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas	E. c	0%	M y L	100%	S. a	75%	S	0%	L. m	0%
Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas												
E. c	0%												
M y L	100%												
S. a	75%												
S	0%												
L. m	0%												
<p>Mercado IZ</p>	<p>Porcentaje de muestras positivas</p> <p>Microorganismos Indicadores de Calidad</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Microorganismo</th> <th>Porcentaje de Muestras Positivas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E. c</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>M y L</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S. a</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>L. m</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>	Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas	E. c	0%	M y L	100%	S. a	100%	S	0%	L. m	0%
Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas												
E. c	0%												
M y L	100%												
S. a	100%												
S	0%												
L. m	0%												
<p>Mercado JC</p>	<p>Porcentaje de muestras positivas</p> <p>Microorganismos Indicadores de Calidad</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Microorganismo</th> <th>Porcentaje de Muestras Positivas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E. c</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>M y L</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S. a</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>L. m</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>	Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas	E. c	0%	M y L	100%	S. a	100%	S	0%	L. m	0%
Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas												
E. c	0%												
M y L	100%												
S. a	100%												
S	0%												
L. m	0%												
<p>Mercado MT</p>	<p>Porcentaje de muestras positivas</p> <p>Microorganismos Indicadores de Calidad</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Microorganismo</th> <th>Porcentaje de Muestras Positivas</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>E. c</td> <td>60%</td> </tr> <tr> <td>M y L</td> <td>80%</td> </tr> <tr> <td>S. a</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>S</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>L. m</td> <td>0%</td> </tr> </tbody> </table>	Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas	E. c	60%	M y L	80%	S. a	0%	S	0%	L. m	0%
Microorganismo	Porcentaje de Muestras Positivas												
E. c	60%												
M y L	80%												
S. a	0%												
S	0%												
L. m	0%												



E.c: *Escherichia coli*

M y L: Mohos y Levaduras

S. a: *Staphylococcus aureus*

S: *Salmonella spp.*

L. m: *Listeria monocytogenes*

Figura 13. Gráficos de Indicadores de Calidad microbiológica de las muestras analizadas para cada mercado muestreado.

En general con los datos microbiológicos recabados de las 126 muestras de queso fresco no pasteurizado obtenidas de 20 mercados de la Ciudad de Puebla se determinó el porcentaje general de las muestras de quesos frescos analizados que exceden los valores máximos permisibles que establece la NOM-243-SSA1-2010, el cual se muestra en la Figura 14.

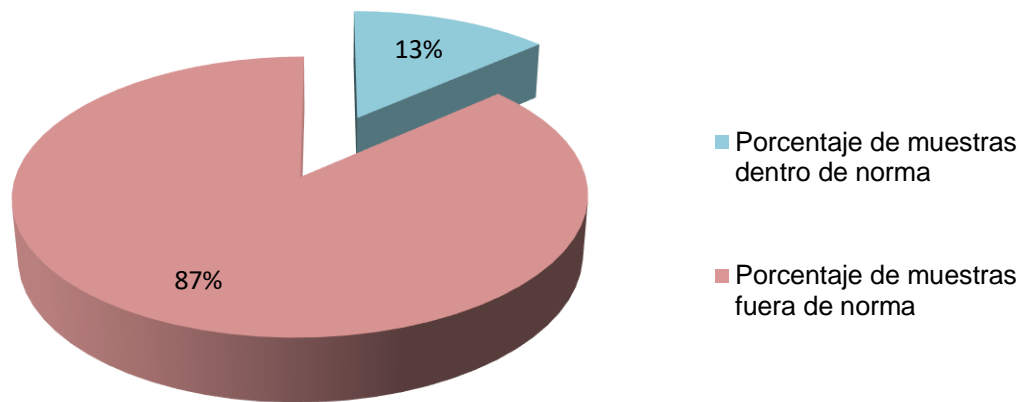


Figura 14. Gráfico del porcentaje general de muestras que exceden los valores máximos permisibles de la NOM-243-SSA1-2010.

Por lo tanto con los datos que presenta la Figura 14 se puede observar tan solo un 13% de cumplimiento a la norma NOM-243-SSA1-2010. Lo cual señala el preocupante estado en el que se encuentran este tipo de productos que además están listos para consumir, situación que se puede atribuir tanto a las condiciones de elaboración como a la forma de transporte y la condición de los puntos de venta.

Además de que mediante el estudio de trazabilidad realizado con la información recabada durante las entrevistas, se determinó la procedencia de las muestras de queso fresco no pasteurizado que dieron resultados positivos para la identificación de *Listeria monocytogenes*, lo cual se observa en la Figura 15.

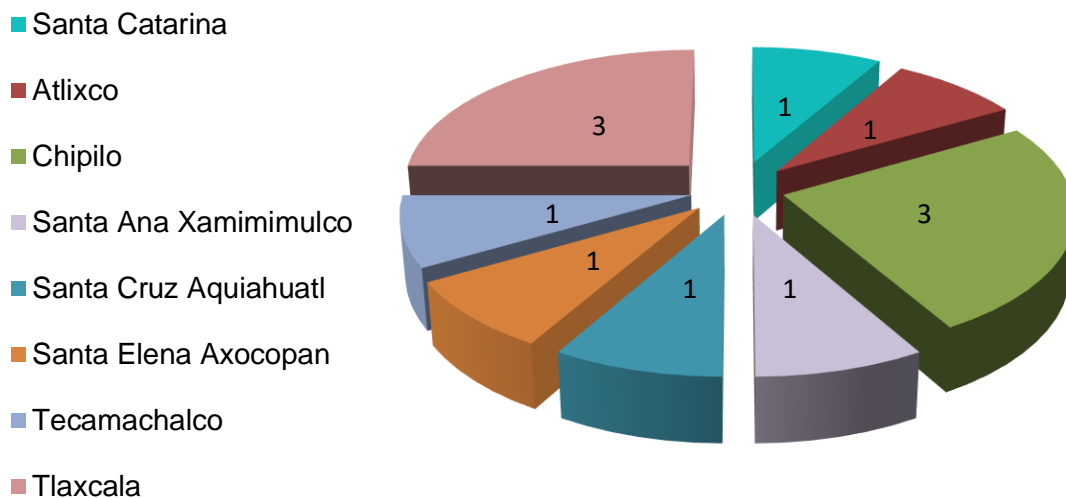


Figura 15. Gráfico que muestra el número de quesos frescos no pasteurizados que dieron resultados positivos para la detección de *Listeria monocytogenes* por lugar de procedencia.

De este modo se puede observar en el gráfico de la Figura 15, que de los 28 lugares de procedencia se encontró a *L. monocytogenes* en muestras de 8 distintos lugares; de los cuales Chipilo fue el lugar con mayor número de muestras positivas (3/8) que representan el 13% de las muestras obtenidas de este lugar, al igual que Tlaxcala donde el mismo número de muestras representan el 15.7% de positivos, lo cual no expone una razón en específico a la cual se pueda adjudicar la contaminación de los quesos con *L. monocytogenes* ya que las frecuencias altas observadas se pueden atribuir a que fueron los lugares con mayor número de muestras analizadas. Además de que se tiene una cantidad considerable de lugares de procedencia en los que se identificó a este patógeno.

Resulta de interés señalar que los demás orígenes no presentan una gran cantidad de muestras, y lugares como Santa Catarina y Santa Elena Axocopan presentaron un queso contaminado de los dos analizados, situación que resulta preocupante al observar el porcentaje individual (50%) de contaminación y presencia de patógenos de riesgo como lo es *Listeria monocytogenes*.

CONCLUSIONES

La incidencia de *Listeria monocytogenes* fue del 9.5% de un total de 126 muestras de quesos frescos no pasteurizados de leche de vaca provenientes de distintos mercados de la ciudad de Puebla.

Se identificó a *L. monocytogenes* en el 16% de los mercados muestreados (4/20).

Se estandarizó la técnica de PCR para la amplificación de los genes *iap 60* y *hly*, de *L. monocytogenes*, donde se obtuvo una mayor especificidad para el gen *hly*, cuyo tamaño fue de 206 pb después de la secuenciación.

Sólo el 13% de las muestras de queso analizadas cumplieron con los valores establecidos por la normatividad.

Los quesos que presentaron contaminación con *L. monocytogenes* provenían de 8 distintos lugares de los 28 lugares de procedencia reportados.

La técnica de PCR es rápida y sensible, y puede ser una opción útil para la industria alimentaria como reemplazo o confirmación de las técnicas microbiológicas tradicionales de detección de microorganismos patógenos, las cuales resultan ser de tiempo prolongado.

BIBLIOGRAFÍA

ARNAIZ-VILLEN A; REGUEIRO J. R; LARREA C. L.

Inmunología

España, Editorial Complutense, 1995

ANDERSON, M. R, P. & PASCUAL V. C.

Microbiología Alimentaria: Metodología Analítica para Alimentos y Bebidas

España, Ediciones Díaz de Santos, 2000

CABELLO, R. R.

Microbiología y Parasitología Humana

México, Editorial Médica Panamericana, 2004

CASTAÑEDA-RUELAS, G.; ESLAVA-CAMPOS, C.; CASTRO DEL- CAMPO, N.; LEÓN-FÉLIX, J.; CHAIDEZ-QUIROZ, C.

Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica.

Salud Pública de México, 56(6): 654-659, 2014, Recuperado en 15 de marzo de 2018, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342014000600016&lng=es&tlng=es

CASTRO-CASTILLO, G.; MARTÍNEZ-CASTAÑEDA, F. E.; MARTÍNEZ-CAMPOS, A. R.; ESPINOZA-ORTEGA, A.

Caracterización de la microbiota nativa del queso Oaxaca tradicional en tres fases de elaboración.

Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, Caracas. 33: 105-109, 2013

CASTRO, J. E. Z.

Manual de Técnicas Básicas de Biología Molecular

México, Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, 2005

Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC)

Sistema nacional de notificación de brotes (NORS).

Recuperado en 26 de marzo de 2018 de: <https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>

Centers for Disease Control and Prevention. (CDC)

Multistate outbreak of Listeriosis linked to imported frescolina Marte brand ricotta salata cheese.

2012, Recuperado en 30 de marzo de 2018 de:
<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (CDC)

Multistate outbreak of listeriosis linked to Crave Brothers Farmstead cheeses (final update)

2013, Recuperado en 30 de marzo de 2018 de:
<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (CDC)

Oasis Brands, Inc. Cheese Recalls and Investigation of Human Listeriosis Cases (Final Update)

2014, Recuperado en 30 de marzo de 2018 de:
<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-10-14/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (CDC)

Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Cheeses Distributed by Karoun Dairies, Inc. (Final Update)

2015, Recuperado en 30 de marzo de 2018 de:
<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheeses-09-15/index.html>

Centers for Disease Control and Prevention. (CDC)

Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Raw Milk Cheese Made by Vulto Creamery (Final Update)

2017, Recuperado en 30 de marzo de 2018 de:
<https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html>

DOYL, M. P.; BEUCHAT, L. R.; MONTVILLE, T. J.

Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras

España, Acribia S.A., 2001

EBERLE K. N., KIESS A. S.

Phenotypic and genotypic methods for typing Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in poultry.

Poult. Sci. 91: 255–264, 2012.

ESCARTÍN E. F.

Microbiología e Inocuidad de los Alimentos

México, Ediciones de la Universidad Autónoma de Querétaro, 2000

ESCOBAR-ZEPEDA A., SANCHEZ-FLORES A., MARICARMEN QUIRASCO B.

Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota

Food Microbiology, 57: 116-127, 2016.

FRAZIER, W.C & WESTHOFF, D.C.

Microbiología de los alimentos

España, Acribia S.A., 1993

GONZÁLEZ-MONTIEL, L. & FRANCO-FERNÁNDEZ, M. J.

Perfil microbiológico del queso de aro consumido en la Cañada Oaxaqueña

Brazilian Journal of Food Technology, Campinas. 18 (3): 250-257, 2015

JAY, J. M.

Microbiología Moderna de los Alimentos

España, Acribia S.A.

MORENO, A. S.

Leche y sus derivados

México, Trillas, 2007

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

Listeriosis

Recuperado en 26 de marzo de 2018, de:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/en/>

RESÉNDIZ, M. R.; HERNÁNDEZ, Z. J. S.; RAMÍREZ, H. R.; PÉREZ, A. R.

El queso fresco artesanal de la canasta básica y su calidad sanitaria en Tuzupapan, México.

Actas Iberoamericanas de Conservación Animal, Córdoba. 2: 253-255, 2012.

RYSER, E. T. & MARTH, E. H.

Listeria, Listeriosis, and Food Safety

CRC Press, 2007

RYU J.; PARK S.H.; YEOM Y.S.; SHRIVASTAV A.; LEE S.; KIM Y.; KIM H.

Simultaneous detection of Listeria sp. isolated from meat processed foods using multiplex PCR.

Food Control 32 (2): 659-664, 2013

SCOTT, R.

Fabricación de queso

España, Acribia S.A., 2003

SILVA, G. S. E.; RESÉNDIZ, M. R.; HERNÁNDEZ, Z. J. S.; PÉREZ, A. R.; PÉREZ, B. J.

El queso fresco artesanal de vaca: calidad bacteriológica.

In. Simposio iberoamericano sobre conservación y utilización de recursos zoonóticos, XI: 478-482, 2010

SOTO-BELTRAN, M.; GERBA, C.P.; PORTO, F.A.; LUCHANSKY, J.B.; CHAIDEZ, C.

Prevalence and characterization of Listeria monocytogenes, Salmonella and Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from small Mexican retail markets of queso fresco.

Int J Environ Health Res. 25(2):140-8, 2015

SECRETARÍA DE SALUD.

PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM-109-SSA1-1994, Bienes y servicios. Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos para su análisis microbiológico

Recuperado en 15 de Marzo de 2018 de:
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4758571&fecha=04/11/1994

SECRETARÍA DE SALUBRIDAD Y ASISTENCIA.

Norma oficial mexicana NOM-143-SSA1-1995, bienes y servicios. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de Listeria monocytogenes

Recuperado en 15 de Marzo de 2018 de:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/143ssa15.html>

SECRETARÍA DE SALUD.

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.

Recuperado en 15 de Marzo de 2018 de:
http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5160755&fecha=27/09/2010

TORRES, K.; SIERRA, S.; POUTOU, R.A.; CARRASCAL, A.K.; MERCADO, M.

Patogénesis de Listeria monocytogenes, microorganismo zoonótico emergente.

Revista MVZ Córdoba.10 (1): 511-543, 2005

WILLIAMS, A. G. & WITHERS, S. E.

Microbiological characterisation of artisanal farmhouse cheeses manufactured in Scotland.

International Journal of Dairy Technology, 63: 356-369 2010, doi:10.1111/j.1471-0307.2010.00596.x

Por riesgo de listeria retiran alimentos congelados en México

Excelsior, 20/05/2016, Recuperado en 29 de marzo de 2018 de:
<http://www.excelsior.com.mx/nacional/2016/05/20/1093882#view-1>