



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PRESENCIA DE *Listeria monocytogenes*  
EN MUESTRAS DE QUESO FRESCO Y LECHE, POR  
PRUEBAS MICROBIOLÓGICAS Y MOLECULARES,  
PROVENIENTES DE PUNTOS DE VENTA DEL ESTADO DE  
MÉXICO E HIDALGO

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA  
PRESENTA:

JOCELIN LEDESMA LÓPEZ

ASESORES

Dr. ORBELÍN SOBERANIS RAMOS  
MVZ. MSP. JORGE CÁRDENAS LARA



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## DEDICATORIA

A Dios, por darme la oportunidad de vivir, por estar conmigo en cada paso que doy, por cuidarme, por bendecirme, por protegerme, por fortalecer mi corazón, por iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Son muchas las personas en mi vida a quienes quiero agradecer su tiempo, su apoyo, motivación, su cariño, compañía, amor y amistad. A todos aquellos que creyeron en mí, a aquellos que siguieron mis pasos hacia la culminación de mis estudios, a aquellos que esperaban que lograra terminar la carrera, a todos los que supusieron que lo lograría, a ellos les dedico esta tesis. Algunos están aquí conmigo, otros en mis recuerdos, sin importar en donde estén o si llegan a leer esto, quiero que sepan que les agradezco infinitamente todo lo que me han brindado.

A todos ustedes con mucho cariño.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al personal del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por el apoyo otorgado a través del proyecto PAPIME 201713 “Aplicación de la biología molecular en la inocuidad de los productos y subproductos lácteos para el fortalecimiento de la enseñanza de la medicina veterinaria y zootecnia”.

A mis asesores el Dr. Orbelin Soberanis Ramos y el Dr. Jorge Cárdenas, por su gran ayuda en todo momento, por permitirme ser parte de este proyecto, por escucharme, apoyarme y motivarme para la culminación de esta tesis.

Al Dr. Oscar Rodolfo Rodas Suárez por sus enseñanzas y asesorías, por permitirme la realización de la parte práctica de esta tesis en el laboratorio de Microbiología General del departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del instituto Politécnico Nacional, Unidad Lázaro Cárdenas.

A mis sinodales por sus aportaciones para lograr que este trabajo quedara lo más completo posible. Gracias por su tiempo y correcciones.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	1
1.0 INTRODUCCIÓN .....	3
ANTECEDENTES .....	3
LA LECHE.....	4
LISTERIOSIS .....	7
2.0 JUSTIFICACIÓN.....	22
3.0 HIPÓTESIS.....	23
4.0 OBJETIVOS .....	24
5.0 MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
6.0 RESULTADOS .....	35
7. 0 DISCUSIÓN.....	39
REFERENCIAS .....	45

## RESUMEN

LEDESMA LÓPEZ JOCELIN. Presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso fresco artesanal y leche no pasteurizada, por pruebas microbiológicas y moleculares PCR, provenientes de puntos de venta del Estado de México e Hidalgo. (bajo la dirección del Dr. Orbelín Soberanis Ramos y MVZ. MSP. Jorge Cárdenas Lara).

La leche cruda y el queso artesanal son unos de los alimentos vinculados a la transmisión de patógenos como *Listeria monocytogenes*, causante de listeriosis.

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de leche de vaca y queso fresco artesanal que se comercializa sin pasteurizar en Tizayuca y Tulancingo (Hidalgo), en Tecámac (Estado de México). Se analizaron 61 muestras, 21 de leche cruda y 40 de queso, en el periodo 2016 y 2017, utilizando la metodología propuesta por el Instituto Politécnico Nacional (IPN), aislamiento bacteriológico conforme a la NOM-143-SSA1-1995 e identificación molecular, estandarizada con la cepa ATCC 19114 de *L. monocytogenes*, la cual creció perfectamente en los medios de cultivo y en el PCR presentó un producto de 117 pb. En las muestras procesadas no fue posible encontrar *L. monocytogenes*, coincidiendo con los resultados de otros autores consultados. Sin embargo, otros autores resaltan que la leche y el queso son los principales alimentos relacionados con la transmisión de listeriosis humana, por lo que no se puede descartar su presencia definitiva ya que se trata de una bacteria ubicua.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

### ANTECEDENTES

Los alimentos son parte fundamental de la vida del hombre, proveen diferentes sustancias esenciales que contribuyen a la salud y al funcionamiento adecuado del organismo, sin embargo, pueden ser el vehículo de transmisión de diversos agentes infecciosos (Rodas, 2009). Los alimentos crudos de origen animal son los que tienen mayor probabilidad de estar contaminados con microorganismos. Dentro de estos, la leche de origen bovino y sus derivados pueden albergar una variedad de ellos, convirtiéndose en importantes fuentes de patógenos causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETA) (Rodas, 2009; Zumbado y Romero 2016).

Las ETA, son un síndrome originado por la ingestión de alimentos y/o agua que contienen agentes etiológicos, en cantidades tales, que afectan la salud del consumidor. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), constituyen un grave problema de Salud Pública a nivel mundial, causando un gran impacto socioeconómico (OMS 2015; Soto *et al.*, 2016).

En Latinoamérica se han registrado durante los últimos decenios, aumentos significativos de nuevos casos (incidencia) de ETA. Sin embargo, esta incidencia no siempre es reportada a las autoridades de salud, por lo que hay una subnotificación, se estima que solo llegan a figurar en las estadísticas oficiales, del uno al diez por ciento el total de los casos (Díaz *et al.*, 2012; Gallardo, 2016).

La salud y la vida de las personas dependen en gran parte de la calidad nutricional de los alimentos que consumen diariamente, lo que depende a su vez de la calidad higiénica y sanitaria en toda la cadena productiva, desde el campo hasta la mesa del consumidor (Kopper, 2009).

Por los considerandos anteriores, la salud humana está ligada a la salud animal y a su vez, a la producción de alimentos de origen animal (Chavarrías, 2006).

## **LA LECHE**

Existen diferentes definiciones de leche, considerando su origen, se hace referencia al producto de la secreción natural y normal de la glándula mamaria de vacas sanas, obtenida por uno o varios ordeños diarios higiénicos completos e ininterrumpidos, exenta de calostro y que cumpla con las características físicas y microbiológicas establecidas, la cual debe ser sometida a tratamientos térmicos u otros procesos que garanticen su inocuidad (Agudelo y Bedoya, 2005; NOM-243-SSA1-2010).

La leche cruda es aquella que no ha sido sometida a ningún tipo de tratamiento térmico, es decir, su temperatura no ha superado los 40°C, después de ser extraída de la ubre (Paguay, y coronel 2015; Trujillo, 2016).



La leche cruda y subproductos son un medio propicio para el crecimiento de microorganismos que pueden provocar el deterioro del producto y enfermedades en los consumidores (Rivera y Vega, 2014; FAO 2017); dentro de estos destacan: *Escherichia coli* O157:H7 y otros coliformes fecales, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* spp, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium bovis*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*, los que pueden contaminar a la leche, ya sea a través de la excreción directa de la ubre de los bovinos lecheros o después de la ordeña por encontrarse en el ambiente (Zumbado y Romero, 2016; FAO 2017).

La ausencia de estos agentes patógenos, en los lácteos y subproductos, depende de las buenas prácticas de producción, de la temperatura de almacenamiento en el tanque enfriador y durante el transporte, el proceso térmico, de la cadena fría en la distribución hasta el consumidor. No obstante, la contaminación se puede presentar en los distintos eslabones de la cadena alimentaria, pero también, en los hogares y expendios de alimentos preparados para el consumo humano (FAO 2017; Rivera y Vega, 2014; Sánchez *et al.*, 2016).

La frecuencia de brotes asociados al consumo de leche cruda o sus derivados ha puesto de manifiesto la importancia de evaluar las condiciones del ordeño, transporte y su procesamiento (Albarracín *et al.*, 2008). Lo anterior, ha llevado a investigadores y productores de leche a trabajar en el desarrollo de programas para mejorar su calidad y sanidad (Reyes *et al.*, 2011; FAO 2015).

Con la pasteurización de la leche, se ha reducido en gran medida el riesgo de transmisión de enfermedades, sin embargo, gran parte de la población la consume cruda y a través de subproductos, tales como: quesos frescos, natillas y cuajada (Jayarao *et al.*, 2006).

En nuestro país, en las zonas rurales o periurbanas la leche de la ordeña se oferta directamente al consumidor por medio de un sistema de producción basado en pequeños hatos lecheros con amplia variación en el nivel de producción, manejo de la ordeña y prácticas sanitarias (Álvarez *et al.*, 2012).

La elaboración de quesos frescos artesanales constituye una de las principales formas de ingresos, incluyendo de muchos países de Latinoamérica el sector cooperativo y campesino, (Álvarez *et al.* 2012; Martínez *et al.*, 2013). En nuestro país, se estima que más del 50% de la producción nacional de quesos, es elaborada artesanalmente, por medio del abastecimiento de leche de los sistemas de producción de doble propósito y familiar (Solís *et al.*, 2013; Espinosa, 2015).

Los productos artesanales, por su tradición y por sus características relacionadas con su presentación, gozan de una alta aceptación entre la sociedad mexicana. La producción artesanal de quesos en México es muy variada, a tal grado que se conocen por lo menos 40 diferentes tipos de queso, de ellos, destaca la producción de quesos frescos (Sánchez *et al.*, 2016).

El queso fresco artesanal, se elabora a partir de leche cruda y con cuajos naturales, su calidad está influenciada por el área geográfica donde se elabora, sus tradiciones y variantes, ya que la higiene de la leche y sus derivados, son dependientes de los hábitos y procesos productivos de cada región de nuestro país (Martínez *et al.*, 2013).

El queso fresco artesanal, dentro de la gama de productos lácteos elaborados, se considera que cuenta con el mayor número de microorganismos patógenos. Por esta razón, se le ha asociado con mayor frecuencia a brotes de intoxicaciones alimentarias (Espinosa, 2015; Sánchez *et al.*, 2016).

La contaminación de la leche y el queso con *L. monocytogenes* puede abarcar todas las etapas de la cadena agroalimentaria, por factores como la presencia de mastitis subclínica, el deterioro de las instalaciones por los años de uso, la contaminación de pisos y/o equipos, deficientes procedimientos de limpieza y desinfección, temperaturas de almacenamiento inadecuadas, contaminación cruzada, entre otros (Mejía, 2014).

## **LISTERIOSIS**

El género *Listeria* pertenece a la familia *Listeriaceae* (Cuadro 1), algunos autores coinciden en que incluye 17 especies (Cuadro 2).

**Cuadro 1.** Clasificación taxonomía de *L. monocytogenes*

Dominio:	<i>Bacteria</i>
Phylum :	<i>Firmicutes</i>
Clase:	<i>Bacilli</i>
Orden:	<i>Bacillales</i>
Familia:	<i>Listeriaceae</i>
Género:	<i>Listeria</i>
Especie:	<i>Monocytogenes</i>
Nombre binominal:	<i>Listeria monocytogenes</i>

Fuente: Rodas, 2009; Villanueva, 2015.

**Cuadro 2.** Especies de *Listeria*

<b><i>Listeria sensu stricto</i></b>	<b><i>Listeria sensu lato</i></b>
<i>Listeria grayi</i>	<i>Listeria riparia</i>
<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria marthii</i>
<i>Listeria ivanovii</i>	<i>Listeria booriae</i>
<i>Listeria seeligeri</i>	<i>Listeria aquatica</i>
<i>Listeria welshimeri</i>	<i>Listeria rocourtiae</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria floridensis</i>
	<i>Listeria grandensis</i>
	<i>Listeria cornellensis</i>
	<i>Listeria fleischmannii</i>
	<i>Listeria newyorkensis</i>
	<i>Listeria weihenstephanensis</i>

Fuente: Den Bakker *et al.*, 2014; Weller *et al.*, 2015; Orsi *et al.*, 2016.

La principal especie patógena del género *Listeria* es *L. monocytogenes*, responsable de la mayoría de los casos de listeriosis, tanto humana como animal (Hitchins y Jinneman, 2011). En condiciones naturales afecta a los animales domésticos y silvestres, esporádicamente puede afectar al hombre por lo que se le considera una zoonosis (Díaz, *et al.*, 2012).

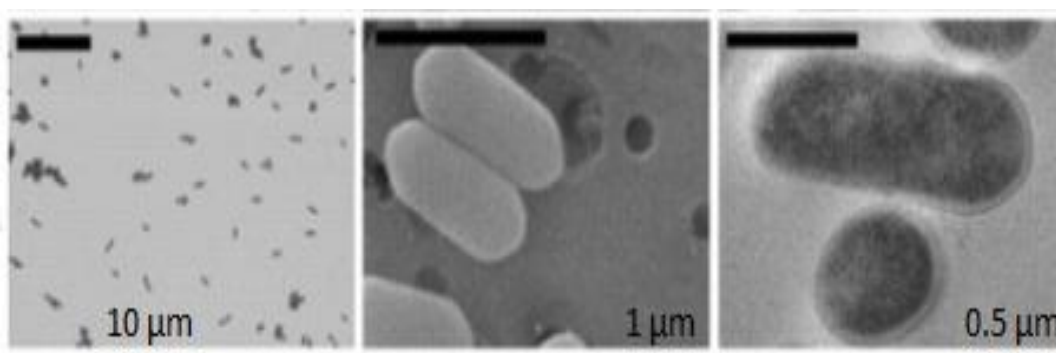
Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de Norteamérica, definen a la listeriosis como una infección grave, causada por consumir alimentos contaminados, recientemente ha sido reconocida como un serio problema de Salud Pública (CDC, 2017).

*L. monocytogenes* es un patógeno capaz de sobrevivir en diferentes ambientes, es posible encontrarlo en la naturaleza, en los suelos, en el agua, las plantas, los ensilados, fertilizantes y vegetación en descomposición, alimentos para animales, alimentos crudos de origen animal (aves frescas y congeladas, carnes rojas y pescado), en productos lácteos crudos, quesos y helados, en frutas y vegetales crudos. También se ha encontrado en heces de seres humanos, en la de animales: como el ganado bovino, ovino o caprino, aves de corral y, aunque raramente, en animales salvajes; quienes pueden ser portadores sanos (Norrung *et al.*, 2009; Pérez y Sigaran, 2012; Castillo y Segura, 2015; Ortiz, 2016; Castañeda *et al.*, 2014).

*Listeria* es un bacilo corto Gram positivo, de extremos redondeados con una longitud entre 0.5-2.0  $\mu\text{m}$  y un diámetro entre 0.5 a 0.8  $\mu\text{m}$  (Figura 1), es un microorganismo intracelular facultativo, anaerobio facultativo, crece en un rango de temperatura de 0° a 50°C, siendo óptimo su crecimiento de 30° - 37°C (Ramaswamy *et al.*, 2007; Guenther *et al.*, 2009; Domínguez, 2014).

Una propiedad peculiar de *L. monocytogenes*, es la de resistir bajas temperaturas, lo que le permite crecer, multiplicarse y acumularse en los alimentos contaminados almacenados en refrigeración. Por ello la listeriosis se asocia generalmente con la ingestión de productos lácteos, carne o vegetales que se han mantenido a temperaturas de refrigeración durante un período de tiempo (Todar, 2012; Castillo y Segura, 2015).

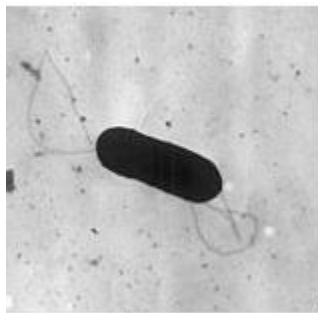
**Figura 1.** Células de *L. monocytogenes* (de izquierda a derecha) Microscopía óptica (MO); Microscopía electrónica de barrido (MEB), Microscopía electrónica de transmisión (MET).



Fuente: Modificado de Wen *et al.*, 2009.

Su movilidad depende de la temperatura a través de flagelos peritricos (Figura 2), siendo móviles cuando se cultivan a temperaturas de 20° a 25°C, pero inmóviles a 37°C (Murray *et al.*, 2006). La expresión de movilidad se puede evidenciar en cultivos semisólidos como una típica formación de sombrilla (Villanueva, 2015). Crece en un rango de pH entre 5.0 a 9.6, pero puede sobrevivir en productos alimenticios con niveles de pH por fuera de este rango (Neogen, 2017).

**Figura 2.** Microscópica electrónica de transmisión (MET) de un flagelado *L. monocytogenes*, magnificado 41,250X.



Fuente: Modificado de Elizabeth White CDC (2002).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que *L. monocytogenes* debido a su amplia distribución, resistencia a condiciones ambientales adversas, y adaptación, puede contaminar los alimentos en distintos pasos de la producción alimentaria y a través de las materias primas utilizadas (Rossi *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2013; Ortiz, 2015; NicAogáin y O'Byrne, 2016).

*L. monocytogenes* es una bacteria intracelular facultativa que ingresa al organismo a través del alimento, tanto del hombre como de los animales (López, *et al.*, 2006; Ramírez, *et al.*, 2013; Sobarzo, 2016).

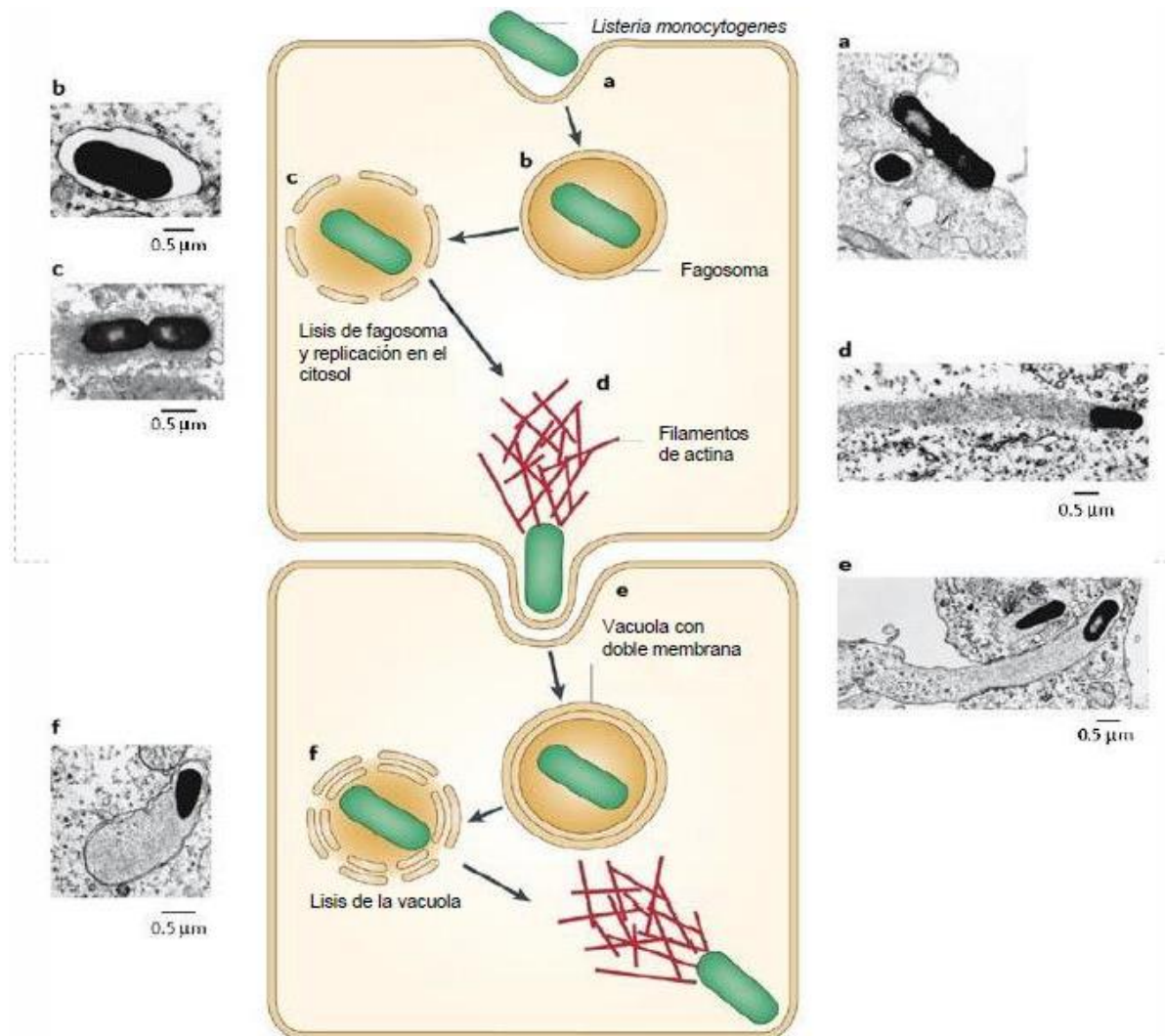
Posteriormente debe sobrevivir a un incremento de temperatura y pH en el estómago, a partir de ahí cruza la barrera intestinal y se multiplica. Una vez que alcanza el torrente sanguíneo y la linfa, la mayoría de las bacterias alcanzan el hígado y bazo, donde pueden replicarse en el interior de los macrófagos (Villanueva, 2015; Cabrera y Valladares, 2016).

El ciclo intracelular de *L. monocytogenes* empieza cuando infecta una célula fagocítica, luego la bacteria induce rápidamente la lisis de su contenido vacuolar mediado por la Listeriolisina O (LLO) y dos fosfolipasas C; para buscar nutrientes en el citoplasma que le permitan multiplicarse. La Listeriolisina O es una toxina citolítica y hemolítica, se considera el factor de virulencia más importante, se activa a pH bajo, y es codificada por el gen *hly* (Castillo y Segura 2015; Villanueva, 2015).

*L. monocytogenes* puede moverse por el citoplasma e infectar otras células fagocíticas a través de la polimerización de filamentos de actina en un polo de la bacteria, dirigido por la proteína *ActA*. La formación de una estructura semejante a una cola de cometa facilita el movimiento intracelular, permitiendo la invasión a células vecinas, mediante un proceso que implica la formación de una protrusión que contiene a la bacteria rodeada por una vacuola de doble membrana (Figura 3) (Vera, *et al.*, 2013).



**Figura 3.** *a.* *L. monocytogenes* induce su entrada a fagocitos no profesionales. *b.* La bacteria es internalizada en una vacuola (también conocida como fagosoma). *c.* La membrana de la vacuola es lisada por la secreción de dos fosfolipasas, *PlcA* y *PlcB*, y la toxina formadora de poros listeriolisina O. *d.* La bacteria es liberada en el citoplasma, donde se multiplican y comienzan a polimerizar colas de actina, *e.* La polimerización de actina permite que las bacterias se diseminen a células vecinas, mediante la formación de protuberancias en la membrana plasmática. *f.* A la entrada de las células vecinas, la bacteria presenta una vacuola con doble membrana, de la cual puede escapar para repetir el ciclo. Se muestran, además, micrografías electrónicas de los procesos descritos.



Fuente: Modificado de Rodas, 2009.

Se conoce que el periodo de incubación tiene un amplio intervalo, que va de uno hasta 91 días, en cantidades extremadamente elevadas de *L. monocytogenes* pueden provocar la rápida aparición de síntomas como vómito y diarrea (Rodas, 2009).

La dosis infectante de *L. monocytogenes* depende de factores como el estado inmunológico del paciente, la concentración de patógeno en el alimento y la cantidad consumida, la virulencia de la cepa (Torres, *et al.*, 2005).

Sin embargo, debido a que las técnicas de recuento no son confiables del todo, por el tiempo transcurrido entre el consumo y el análisis del alimento contaminado, esto podría favorecer la multiplicación o la muerte de las listerias, por ello, es posible que los resultados no siempre sean indicativos de la cantidad de listerias ingeridas. Por consiguiente, estos datos no excluyen la posibilidad de que dosis más bajas sean infecciosas (Becerra, 2013).

En la población existen grupos más sensibles a contraer listeriosis, dentro de estos, las mujeres embarazadas, en las que puede provocar abortos espontáneos, nacimientos prematuros y mortinatalidad. En pacientes inmunodeprimidos por tratamientos contra el cáncer, trasplantados o personas infectadas con VIH, ancianos y niños; donde la sintomatología se presenta como un cuadro invasivo con infección sistémica, septicemia y encefalitis. En personas que no pertenecen a los grupos de riesgo, una infección elevada de *L. monocytogenes* causa cuadros de gastroenteritis o febriles leves similares a una gripe (Rossi *et al.*, 2008).

Como se ha revisado, *L. monocytogenes* puede desarrollarse en toda clase de alimentos, siendo la leche y los productos lácteos (tales como el queso fresco artesanal), los que presentan mayor riesgo de ser contaminados por la bacteria (Mejía, 2014). Existe evidencia de que una alta proporción de los casos de listeriosis en humanos es adquirida por ingestión de alimentos contaminados (Noriega *et al.*, 2008).

El primer reporte de listeriosis en humanos se dio en Dinamarca en 1929; sin embargo, esta enfermedad comenzó a ser de interés hasta la década de 1980, debido a la presentación de epidemias, es por ello que partir de 1981 se han descrito brotes y casos de listeriosis con una alta tasa de mortalidad (del 20% al 30% de los casos), los cuales se han asociados al consumo de gran variedad de alimentos (Cuadro 3). Cabe destacar, que en los brotes de Massachusetts, California y Francia estuvieron asociados al consumo de leche no pasteurizada y quesos frescos elaborados con esa leche (Cuadro 3) (Rodas, 2009; Villanueva, 2010; Castañeda *et al.*, 2014).

**Cuadro 3.** Brotes de Listeriosis por consumo de leche y queso.

<b>Año</b>	<b>País</b>	<b>Alimento</b>	<b>N° casos</b>	<b>N° Muertos</b>
1983-1984	Suiza	Queso tierno	122	34
1985	EUA (California)	Queso estilo mexicano	142	47
1995	Francia	Queso fresco	37	11
1997	Francia	Queso fresco elaborado con leche cruda	14	
2002	EUA	Queso fresco tipo mexicano elaborado con leche cruda	13	5 abortos
2002	Canadá	Queso elaborado con leche cruda	17	3 abortos
2007	Suiza	Queso suave	21	5
2009	Austria y Alemania	Queso duro	14	4
2011	EUA	Queso fresco	22	4
2013	EUA	Queso fresco	6	1
2014	EUA	Queso fresco	8	1
2015	EUA	Helado	10	3
2015	EUA	Queso suave	30	3
2016	EUA	Leche cruda	2	1
2017	EUA	Queso fresco	8	2

Fuente: Modificado de Instituto Nacional de Salud, 2011; Vila, 2014; CDC, 2012; CDC, 2013; CDC, 2014; Vilchis, 2016; CDC, 2016; CDC, 2017.

Como se ha descrito anteriormente, la listeriosis puede presentarse con una baja frecuencia, pero poco a poco se ha ido convirtiendo en una de las ETA más letales, causando gran alarma a nivel mundial a productores de alimentos, consumidores y autoridades sanitarias (Schöbitz *et al.*, 2009).

En México, no se dispone de información sobre la incidencia y prevalencia de este microorganismo, debido a que los procesos gastroentéricos por *L. monocytogenes* no se declaran, o bien son incluidos en otros procesos diarreicos, porque no se determina el agente etiológico (Mejía, 2014).

Es importante mencionar que, en México la listeriosis no es una enfermedad de reporte obligatorio en humanos (Rosas *et al.*, 2014), sin embargo, llega a causar graves infecciones en ellos. En el caso de los animales es una enfermedad invasiva, por ejemplo: en los rumiantes (vacas, ovejas y cabras), causa encefalitis, septicemia, abortos, uveítis, mastitis, gastroenteritis, mielitis espinal y fiebre, en animales domésticos está asociada a encefalitis, abortos y septicemia. Por lo tanto, es obligatorio un reporte mensual de estos casos a las autoridades competentes debido a que los productos alimenticios derivados de estos animales han sido frecuentemente implicados como fuentes de casos y de brotes de listeriosis en humanos. (SAGARPA, 2007; Muñoz *et al.*, 2013; Secretaria de Salud, 2013; Ramírez, *et al.*, 2013).

La detección de *Listeria* en alimentos se ha ido desarrollando en los últimos años y podemos encontrar una gran variedad de métodos que van desde el aislamiento e identificación de la bacteria mediante técnicas microbiológicas convencionales y técnicas moleculares, como lo es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (Palomino-Camargo y González, 2014).

Los métodos de aislamiento deben ser lo suficientemente precisos para detectar un microorganismo en 25 gramos de alimento, generalmente esta sensibilidad sólo puede lograrse mediante el uso de medios de enriquecimiento (NOM-143-SSA1-1995).

El nivel de *L. monocytogenes* tolerado en los países es muy variable y va de 0 en 25 g en Estados Unidos de América, hasta la presencia de 100 UFC/g en las normas de la Unión Europea, en nuestro país la tolerancia es cero (Mesa, 2016).

La Norma Oficial Mexicana (NOM-143-SSA1-1995), para la determinación de *L. monocytogenes* en alimentos, considera un procedimiento analítico de tres fases: pre-enriquecimiento, aislamiento en medios selectivos e identificación de especies mediante pruebas de cultivo y bioquímicas. El proceso completo requiere al menos 5-6 días (NOM-143-SSA1-1995).

En el método establecido por la Bacteriological Analytical Manual (BAM-FDA) se realiza un enriquecimiento de 48 horas incubando a 30°C en caldo de enriquecimiento para *Listeria*, el cual contiene agentes selectivos (acriflavina que inhibe el crecimiento de

otras bacterias Gram positivas; ácido nalidíxico, que inhibe bacterias Gram negativas y el fungicida cicloheximida). Después del enriquecimiento se realiza el aislamiento en agar selectivo (Oxford, Palcam, MOX o LPM) (González- Zorn, 2009; Mejía, 2014;).

Un método alternativo a los métodos convencionales muy empleado es la técnica de PCR en tiempo real, ya que permite la identificación y la cuantificación de *Listeria* a través de la amplificación de material genético. Los métodos que utilizan la técnica de PCR tienen una mayor sensibilidad y rapidez en la detección del patógeno, una de las ventajas que supone el uso de estos métodos es el de acortar significativamente el tiempo requerido para obtener resultados. Mientras que por los métodos convencionales la identificación puede tomar hasta 7 días, el empleo de la técnica de PCR solo toma 2 días (OIE, 2013). Sin embargo, una de sus limitaciones es el costo o el volumen de la muestra (Mejía, 2014).

*Listeria* puede cultivarse bien en agar-sangre, en agar Infusión cerebro corazón (BHI), agar Oxford y agar PALCAM (Romero, 2007; Brooks *et al.*, 2010). Tras una incubación de 24 a 48 horas a 37°C, forman colonias redondas, grisáceas, rodeadas por un halo oscuro y ligeramente convexas, con un diámetro entre 0.5-1.5 mm en medio Oxford, después de las 48 horas de incubación, las colonias se tornan oscuras, con posible brillo verdoso de aproximadamente 2 mm de diámetro, con halos negros y centros hundidos (Figura 4) (NOM- 210-SSA1-2014). En agar sangre da origen a colonias puntiformes, circulares, lisas y translucidas de color azul grisáceo con una zona discreta beta-hemolisis (NOM-143-SSA1-1995).

**Figura 4.** Colonias de *L. monocytogenes* en medio Oxford.



(Análisis Microbiológico de los Alimentos, 2011).

El género *Listeria* presenta reacción positiva con rojo de metilo y Voges-Proskauer, además, todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina y junto con el hierro férrico da lugar a la aparición de un intenso color negro (González-Zorn, 2009; Villanueva, 2015).



**Cuadro 4.** Comparación entre *L. monocytogenes* y algunas otras especies representantes del género *Listeria*.

Prueba	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. grayi</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Movilidad a 25° C	+	-	-	-	-	-
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+
Voges proskauer	+	+	+	+	+	+
D- glucosa	+	+	+	+	+	+
D- manosa	+	+	-	-	+	+
D- manitol	-	-	-	-	-	+
D- xilosa	-	+	-	+	+	-
D- ramnosa	+	-	V	V	-	-
Hidrolisis de la esculina	+	+	+	+	+	+

V= Variable

Modificado de: Rodas, 2009.

## 2.0 JUSTIFICACIÓN

*L. monocytogenes* es un microorganismo patógeno que se considera un problema de Salud Pública por ser una zoonosis de interés a nivel mundial, debido a la importancia que ha adquirido su impacto clínico, además puede llegar a presentar una tasa de mortalidad del 20 al 30%, así como el efecto económico derivado de los brotes asociados con el consumo de alimentos (ETA).

En México, no se cuenta con información de los brotes originados por este microorganismo, debido a que no es de búsqueda obligatoria por las autoridades sanitarias y por carecer de un registro de su frecuencia de aislamiento o incidencia.

Por lo anterior, es relevante que productores, consumidores y autoridades sanitarias formulen estrategias y acciones para conocer su frecuencia; para lo cual se propone una búsqueda intencionada de *L. monocytogenes* en muestras de queso fresco artesanal y leche bronca, que sirvan de base para estudios epidemiológicos más robustos en un futuro inmediato.

### 3.0 HIPÓTESIS

*L. monocytogenes* es un patógeno intracelular facultativo que puede estar presente en animales sanos o enfermos, considerando que la contaminación puede ser de origen, pudiendo permanecer en la leche y el queso fresco artesanal elaborado con leche contaminada por el microorganismo, entonces es factible determinar su presencia en por lo menos el 10% de las muestras estudiadas de los de puntos de venta del estado de México e Hidalgo.

## 4.0 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

- Determinar la presencia de *L. monocytogenes*, a partir de muestras de leche y queso fresco artesanal de expendios del Municipio de Tecámac, Estado de México, Tizayuca y Tulancingo, Hidalgo, mediante cultivo y aislamiento, identificación bioquímica y molecular por PCR punto final, para determinar el riesgo en la población que consume productos y subproductos lácteos.

### 4.2 Objetivos Específicos

- Analizar microbiológicamente las muestras de leche y queso de acuerdo a la NOM-143-SSA1-1995 con modificaciones en el tiempo de incubación en el pre-enriquecimiento (6 días).
- Identificar a *Listeria monocytogenes* mediante pruebas bioquímicas y PCR punto final.
- Conocer los hábitos de consumo de queso y leche de los habitantes en la zona de estudio por medio de una encuesta.

## 5.0 MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño de estudio epidemiológico es transversal, el área de estudio fueron los puntos de venta, en los Municipio de Tecámac, Estado de México, Tizayuca, y Tulancingo, Estado de Hidalgo.

### **Metodología**

Se realizó un muestreo por conveniencia en expendios que tenían a la venta leche bronca y productos lácteos no pasteurizados, tales como queso fresco, tipo (panela, rancho, queso de aro, queso de palma y canasto, principalmente). Considerando entre ellos tiendas de abarrotes, cremerías, queserías, mercados, tianguis, y algunos de compra directa con los boteros (expendedores en bicicleta de leche) en la zona de estudio.

En los sitios anteriormente citados en el periodo de 2016 a 2017, fue posible adquirir por lo menos un litro de leche bronca y al menos 250 g de queso fresco artesanal no pasteurizado, obteniendo en total 40 muestras de queso y 21 litros de leche bronca.

Las muestras de leche fueron transportadas en envase estéril de vidrio con tapón de rosca, las de queso dentro de una bolsa estéril con cierre hermético. Todas las muestras se transportaron en refrigeración a una temperatura de 4°C, durante su traslado al laboratorio.

Las muestras fueron procesadas para su análisis bacteriológico y molecular en el laboratorio de Microbiología General del departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del instituto Politécnico Nacional, Unidad Lázaro Cárdenas, bajo la supervisión del Dr. Oscar Rodolfo Rodas Suárez, siguiendo los “Procedimientos para el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de productos lácteos” y “Extracción de ADN de *L. monocytogenes* por medio del Kit PROMEGA”.

### **“Procedimientos para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de productos lácteos”**

La Norma Oficial Mexicana (NOM-143-SSA1-1995), para la determinación de *L. monocytogenes* en alimentos, considera un procedimiento analítico de tres fases: pre-enriquecimiento, aislamiento en medios selectivos e identificación de especies mediante pruebas de cultivo y bioquímicas (NOM-143-SSA1-1995).

#### **Pre - Enriquecimiento:**

De la muestra de queso se tomó 25 g, tanto de la superficie externa como del interior con ayuda de un cuchillo en una bandeja estéril, y 25 mL de leche, medida con tubos falcón estéril de 50 mL.

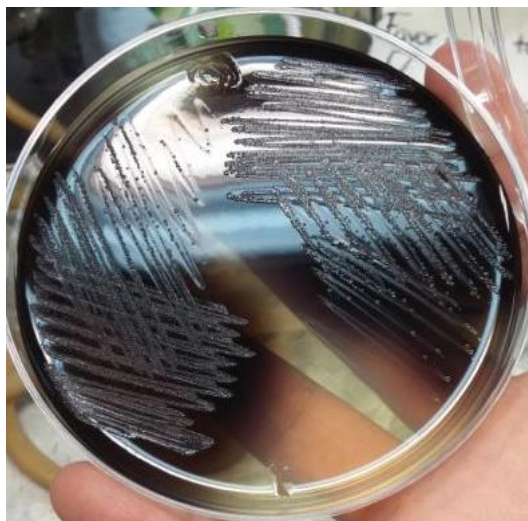
Se colocaron 25 mL o 25 g de las muestras de queso o leche en frascos Schott de 500 mL (Kimax) ® que contenían 225 mL de caldo de Enriquecimiento Base Listeria (LEB-Merck®), se homogeneizaron e incubaron a 30° C por 6 días.

## Aislamiento:

A las 24 horas de incubación de la muestra en el caldo de enriquecimiento para *Listeria* se realizó la primera siembra por estría cruzada en una placa de medio Oxford, después se realizaron siembras por estría cruzada durante el 3°, 4° y 6° día. Cada placa de medio Oxford (Difco)®, se puso a incubar a 35° C durante 24 hrs.

Se examinaron macroscópicamente las colonias que crecieron en el medio selectivo Oxford, se seleccionaron colonias típicas del medio, que presentaban las características principales como hidrolizar la esculina, ser pequeñas, redondas, translúcidas, ligeramente convexas y tener un color grisáceo (Figura 5), a las cuales se le evaluaron: producción de catalasa (Figura 6) y tinción de Gram (Figura 7). Las colonias presuntivas, compatibles con *Listeria* spp. fueron reaisladas en placas con agar soya tripticaseína con 0,6% de extracto de levadura (ASTEL) para su purificación con incubación a 35° C por 24 horas, hasta su uso en las pruebas de identificación.

**Figura 5.** Aislamiento de *L. monocytogenes* (ATCC 19114) en medio Oxford.



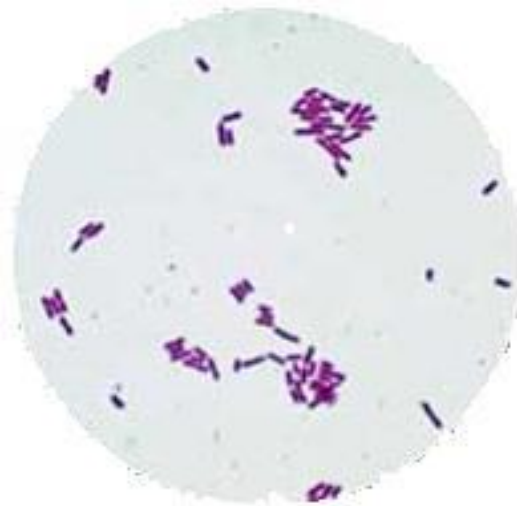
(Foto de: Jocelin Ledesma López, 2017).

**Figura 6.** Catalasa positiva ATCC 19114.



(Foto de: Jocelin Ledesma López, 2017).

**Figura 7.** Tinción de Gram *L. monocytogenes* ATCC 19114.



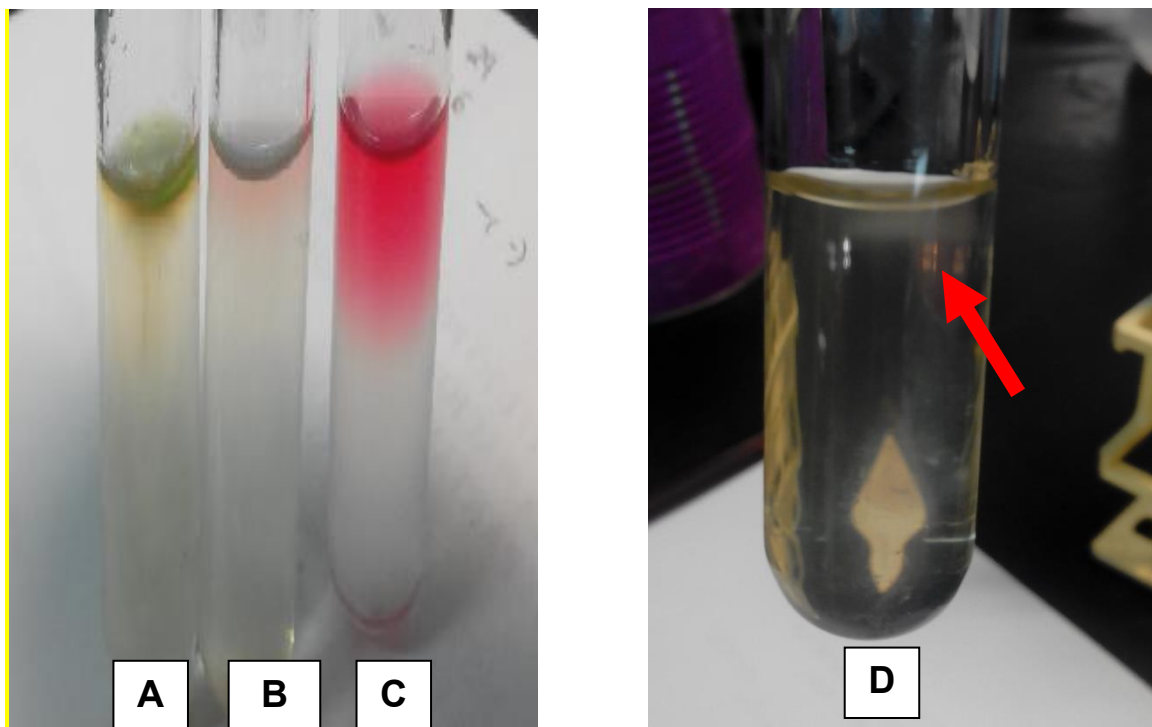
(Foto de: Jocelin Ledesma López, 2017).



### Identificación Bioquímica:

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas para las cepas presuntivas a *L. monocytogenes* las cuales se incubaron 7 días a temperatura ambiente. Movilidad en medio SIM (Sulfhidro (-), Indol (-), Movilidad (+) a 25° C), Rojo de metilo (+), Voges Proskauer (+), manosa (+), ramnosa (+), manitol (-) y xilosa (-).

**Figura 8.** Pruebas bioquímicas ATCC 19114. **A)** Medio SIM. **B)** Medio -Voges-Proskauer. **C)** Medio Rojo de metilo. **D)** *L. monocytogenes* movilidad (+) en agar (SIM), crecimiento en forma de paraguas (tubo señalado con la flecha).



(Fotos de: Jocelin Ledesma López, 2017).

**Extracción de ADN de *Listeria monocytogenes* por medio de Wizard Genomic DNA Purification Kit PROMEGA TM050 (Schagat, et al., 2013)**

Se colocaron 25 mL o 25 g de cada muestra de queso y leche en frascos Schott de 500 mL (Kimax) ® que contenían 225 mL de caldo de Enriquecimiento Base Listeria (LEB- Merck®) se homogeneizaron e incubaron a 30° C por 6 días. A las 24 horas de la incubación se realizó la extracción de DNA.

1. Se depositó en un tubo de microcentrifuga, 1.5 mL del caldo de enriquecimiento de Listeria homogeneizado con la muestra de leche o queso.
2. Se centrifugó por 5 minutos a 14000 RPM para obtener un paquete celular. Se desechó el sobrenadante, y se adicionaron 150 µL de buffer TE (Tris 10 mM-EDTA 1Mm) se homogenizó por vórtex durante 1 minuto.
3. Se le adicionó 10 µL de lisozima (25 mg/mL en Tris), e incubó la muestra a 37°C durante 30 min, transcurrido el tiempo se adicionaron 150 µL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), y 500 µL de solución de lisis.
4. Se homogenizó la mezcla con vórtex durante 1 min, se incubó durante 1 min en hielo, repitiendo este paso tres veces.
5. Posteriormente se incubó la mezcla a 65°C durante 30 minutos, dejándola enfriar a temperatura ambiente, una vez terminado el periodo de incubación se adicionaron 200 µL de solución de precipitación de proteínas, que contenía el Kit de Promega, se homogenizó por vórtex e Incubó 5 min en hielo.
6. Después se adicionaron 200 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se agitó por vórtex 5 minutos y centrifugó 5 minutos a 14000 RPM para dividir la muestra en dos fases, la fase acuosa se pasó a un tubo limpio de 1.5 mL, que contenía

300 µL de cloroformo, se homogenizó la mezcla por inversión, se centrifugó por 5 min a 14000 RPM.

7. Se recolectó el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL que contenía 500 µL de isopropanol, se dejó incubar a -20°C durante toda la noche.
8. Al día siguiente se centrifugó 5 minutos a 14000 RPM
9. Se eliminó el sobrenadante, el isopropanol restante se removió con papel absorbente y se le adicionó 500 µL de etanol frío al 70%.
10. Se centrifugó 5 minutos a 14000 RPM y cuidadosamente se eliminó el etanol, se puso a desecar durante 20 min. Se adicionaron 20 µL de solución de rehidratación de ADN
11. Se almacenó en refrigeración de -2 a -8°C.

El ADN resultante de la extracción se cuantificó por medio de espectrofotometría con el NanoDrop (espectrofotómetro ND-1000), obteniendo las siguientes mediciones de las muestras presuntivas a *L. monocytogenes* de ADN en 1 uL: M55: 186.7 ng/uL; M48:65.7 ng/uL; M47:137.8 ng/uL; M42:60.6 ng/uL; M61:177.5 ng/uL. Para el caso del control positivo de la ATCC 19114 se cuantificó 550 ng/uL de ADN. Para determinar la integridad del ADN se corrió un gel de agarosa al 1% y se visualizó en un lector de geles.

Se realizó la detección de *Listeria monocytogenes*, en productos lácteos, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, después de la extracción de ADN (Schagat, 2013), con la finalidad de determinar rápidamente la inocuidad del producto.

Se utilizaron los iniciadores probados para la amplificación del gen *hly* de *L. monocytogenes hly A177* Forward (5'TGCAAGTCCTAAGACGCCA3') y *hly A177* Reverse (5'CACTGCCATCTCCCGTGGTATACTAA3') (Barbau-Piednoir, *et al.*, 2012). Los 6 principales genes asociados a la virulencia de *L. monocytogenes* (*prfA plcA, hly, plcB, mpl* y *actA*) están unidos en una región cromosómica de 9kb conocida como: Isla de patogenicidad LIPI-1, que son genes de virulencia asociados a *prfA*. *prfA* es el gen que codifica para una proteína reguladora, la cual activa la transcripción del gen *hly*, y del operón de lecitinasa que incluye los genes *mpl, plcB* y *actA*. El monocistrón *hly*, codifica para la listeriolisina O (Rodas, 2009).

Las concentraciones de la mezcla de reacción, así como las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción de la PCR se muestran en los cuadros 5 y 6.

**Cuadro 5.** Mezcla de reacción empleada en la PCR para la amplificación del gen *hly*.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN INICIAL	VOLUMEN POR REACCIÓN	CONCENTRACIÓN POR REACCIÓN
Regulador	10X	2.50µL	1X
dNTP's	5mM	1.00µL	0.2mM
Iniciador (Forward)	20µM	0.25µL	0.6µM
Iniciador (Reverse)	20µM	0.25µL	0.6µM
Taq DNA pol.	5U/µL	0.10µL	1U
MgCl <sub>2</sub>	50mM	0.75µL	1.5mM
DNA	-----	1.00µL	-----
H <sub>2</sub> O	C.b.p 25µL	19.15µL	-----

Fuente: Contreras, 2016.

Las condiciones de amplificación fueron 94°C/5 min, seguido de 40 ciclos de 94°C/1 min, 61.5 °C/1 min, 72 °C/1 min, y un ciclo final de 72 °C por 5 min. El producto esperado fue de 117 pb para *Listeria monocytogenes*.

**Cuadro 6.** Condiciones de la PCR para la amplificación del gen *hly*.

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura / Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	94°C / 5 min.	1
Desnaturalización Alineamiento Extensión	94°C / 1 min. 61.5°C/ 1min. 72°C/ 1 min.	40
Extensión final	72°C/5 min.	1

Fuente: Contreras, 2016.

Se tomaron 3.5 µl de ADN de la muestra después de la reacción de PCR y se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, usando como referencia el marcador de peso molecular de 100 pb y bromuro de etidio como marcador colorante. Finalmente, el gel se visualizó en una cabina de luz UV. La prueba se basó en la amplificación del gen *hly*, con un peso molecular de 117 pb, que codifica para la hemolisina extracelular (listeriolisina O), asociada con el ciclo de infección por *L. monocytogenes* y que es 100% específica para este patógeno.

Para conocer los hábitos de consumo de leche y queso, en el área de estudio, se elaboró y aplicó mediante entrevista, un cuestionario estructurado, para medir la frecuencia de compra, la cantidad, el sitio de compra y consumidores de los productos lácteos dentro del núcleo familiar (Anexo uno). La información obtenida fue capturada en una base de datos con el programa Excel.

A los datos obtenidos de cada variable del cuestionario se les realizó un análisis estadístico, primeramente, un análisis descriptivo de cada variable, mediante frecuencias absolutas y relativas, medidas de tendencia central y de dispersión. Para observar diferencias entre grupos de consumidores de leche y queso, además se realizó un análisis estadístico bivariado.

## 6.0 RESULTADOS

### ENCUESTA

Se realizaron un total de 398 entrevistas con igual número de cuestionarios respondidos, en los tres municipios bajo estudio, la mayor parte 52% (207/398) en el Municipio de Tecámac, Tizayuca 24.6% (98/398) y Tulancingo 23.4 (93/398). La mayoría de las entrevistas fueron realizadas en los Centros de Salud 58.3% (232/398), escuelas 19.3% (77/398) y el resto de diversos sitios 22.4% (89/398), tales como: comercios, parques o plazas públicas, tianguis sobre ruedas, explanada del palacio municipal y en la vía pública.

El 50% (199/398) de los entrevistados tuvo un rango de edad de 26 a 47 años, con una mediana de 34 años. Según la información recabada, había de 1 a 11 personas en cada vivienda, al menos en el 50% (199/398) de los hogares, tuvo 4 ocupantes o menos. El 81% (322/398) de las personas en las entrevistas refirió la presencia de menores de edad en la vivienda.

El 94% (375/398) de los entrevistados refirió el consumo de leche en su vivienda, en los casos en donde no había consumo 6% (23/398), las principales causas de ello fueron: no agrado por el producto o no la necesitan, seguida por problemas de salud como intolerancia, alergia o algún otro malestar; otras causas reportadas en menor porcentaje fueron el retiro del apoyo por parte de Liconsa o la no disponibilidad de este servicio, consumo de leche de soya y finalmente por causas económicas.

En el 94.2% (375/398) viviendas en las cuales se consume leche, reportan que en el 82.1% (308/375) consumen leche pasteurizada, el 16.3% (61/375) adquieren leche sin pasteurizar y 6 de ellos no supieron contestar.

Según la población entrevistada se consume leche bronca en principio por gusto (sabor, olor, entre otros), en seguida por considerarla un alimento nutritivo, natural o más sano y finalmente porque es más económica que la leche envasada en un empaque de cartón.

El consumo de queso entre la población entrevistada fue casi generalizado 97.5% (388/398), las personas que no lo consumían expresaron los siguientes motivos: por falta de dinero (4), no les gusta (2), no les da confianza (1), por alergia (1), por indicación médica (1), un caso no indicó el motivo.

De un total de 388 consumidores de queso, 9 de cada 10 refirieron consumir alguna variedad de queso fresco (89.7%, 348/388). Las variedades de más preferencia fueron el queso panela 53% (184/348), blanco 16% (56/348) y canasto 13% (45/348) respectivamente, con frecuencias más bajas se refirieron combinaciones de dos y hasta cuatro quesos.



En cuanto al tipo de queso que los consumidores adquieren, un 21.13% (82/388) consumen queso sin marca o artesanal, otro hecho que destaca es que una gran parte de los entrevistados (46%, 177/388) no supieron o no recordaron la marca del queso que consumen habitualmente.

Del total de entrevistados, 56% (221/398) reconocieron el riesgo de contraer enfermedades por el consumo de leche y queso sin pasteurizar, sin embargo, muchos no pudieron precisar que problemas de salud en específico.

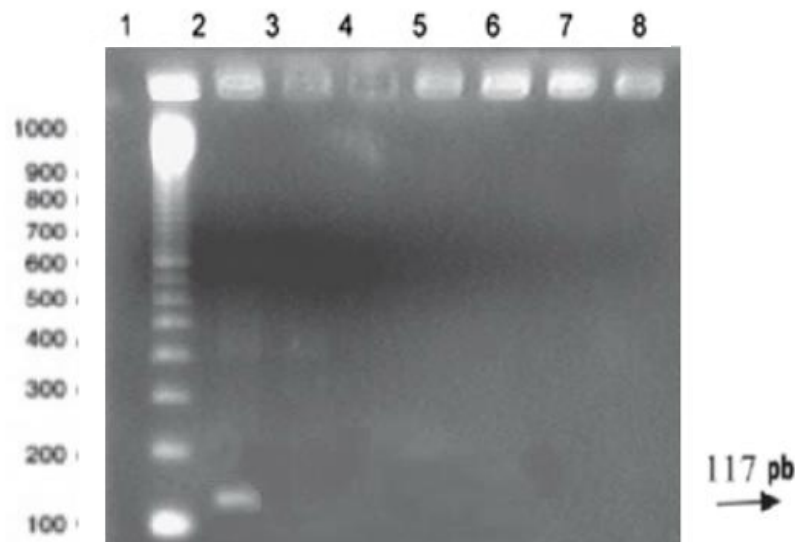
## **RESULTADOS MICROBIOLÓGICO Y PCR.**

De 6,431 establecimientos de venta al por menor y 20 tianguis en el Municipio de Tecámac que tiene registrado el Instituto de Información e Investigación Geográfica, Estadística y Catastral del Estado de México (IGECEM, 2013), 1,494 unidades económicas, de comercio al por menor y un tianguis en Tulancingo, Hidalgo, así como 623 unidades económicas de comercio al por menor en Tizayuca, Hidalgo y 4 tianguis que tiene registrado el INEGI (Nieto, 2017). Se visitaron en total 20 unidades de comercio en Tecámac, distribuidos en: 12 puestos ubicados en el tianguis y 8 tiendas de abarrotes; en Tulancingo, se visitaron 25 unidades de comercio, 14 tiendas de abarrotes, 8 domicilios particulares en los cuales se comercializa leche bronca y se elaboraba queso artesanal, 2 establos y un botero el cual distribuye la leche bronca a domicilio; y en Tizayuca, se visitaron 16 unidades de comercio, de los cuales 9 estaban dentro del Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAITSA), donde se

vendían leche bronca y quesos artesanales, y 7 en tiendas de abarrotes del municipio. Lo anterior permitió obtener 40 muestras de queso y 21 L de leche.

Todas las muestras fueron procesadas para el aislamiento bacteriológico de *L. monocytogenes*, las muestras presuntivas a *L. monocytogenes* se les hizo una identificación molecular por PCR punto final. De las 61 muestras analizadas, 21 L de leche bronca y 40 piezas de queso fresco artesanal, comercializados en el Estado de Hidalgo y Estado de México en los municipios de Tizayuca, Tulancingo y Tecámac, durante los años 2016 y 2017, no se logró determinar la presencia de *L. monocytogenes*, con ninguno de los dos métodos establecidos, el aislamiento bacteriológico ni por la identificación molecular (Figura 9).

**Figura 9.** Resultados negativos de amplificación del gen *hly* (117pb). Carril 1, marcador de peso molecular (100pb), Carril 2, control positivo cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19114, Carril 3, *L. seeligeri* (control negativo); carril 4-8 muestras 42, 47, 48,55 y 61 negativas a *L. monocytogenes*.



(Foto de: Jocelin Ledesma López, 2017).

## 7. 0 DISCUSIÓN

La leche y el queso debido a su contenido nutricional, es uno de los alimentos de alto consumo en el mundo, por lo que se han centrado parte de las investigaciones en la presencia de *L. monocytogenes* (Díaz *et al.*, 2012).

La detección de *L. monocytogenes* en alimentos, especialmente en productos listos para consumo representa un gran reto, debido a que no se altera el producto, tiene dosis infectivas bajas, las características propias de adaptación del microorganismo y la importancia de obtener resultados en poco tiempo (López y Mejía, 2012).

A pesar de que en el presente trabajo no se logró aislar *L. monocytogenes* en leche fresca, ni en queso artesanal, no se puede descartar su presencia definitiva ya que se trata de una bacteria ubicua, por lo que el consumo de productos sin un tratamiento térmico previo sigue siendo un riesgo potencial (Díaz *et al.*, 2012).

La ausencia de *Listeria* spp. en leche cruda puede deberse a varios factores como composición del suelo, tipo de alimentación del ganado, condiciones ambientales, higiene del ordeño y comportamiento bacteriano (Rahimi, 2014).

Las fuentes de *Listeria* spp. en leche cruda se conoce que pueden provenir de la contaminación fecal, del ambiente contaminado durante el ordeño, en el

almacenamiento y transporte, de los animales infectados o enfermos y la mala calidad del ensilaje. Entre la biota del suelo se encuentran algunas especies de *Listeria*, pero por la competencia existente entre la misma y otras especies bacterianas, es escasa su presencia en el forraje (Alba, 2015).

Otro factor que afecta el crecimiento de *Listeria* es la competencia que se da con microorganismos propios de la leche y otros microorganismos patógenos, que hacen más difícil su supervivencia, debido a que deben competir por nutrientes con otras especies con un tiempo de duplicación más corto, como son las coliformes o las bacterias ácido lácticas, estas últimas se alimentan de lactosa provocando su rápido crecimiento y acidificando la leche rápidamente, lo que afecta el crecimiento de *Listeria* (Camacho, 2007).

También puede atribuirse al posible efecto inhibitorio de ácidos grasos propios de la leche, por ejemplo, se conoce que los ácidos laúrico, linoléico y linolénico a  $\text{pH } 5 \pm 0.2$  son bactericidas, provocando la ruptura de la membrana celular. Los ácidos grasos saturados pueden provocar lisis bacteriana por cambios en la fluidez de la membrana lipídica, provocando la muerte automática de la bacteria. Lo anterior se debe a que *Listeria* spp. tiene la capacidad de multiplicarse a valores de pH no menores a 4.4 lo que dificulta su crecimiento con bacterias ácido lácticas que soportan pH de 3.2 (Ramírez, 2011).

Las técnicas convencionales involucran procedimientos prolongados y laboriosos de enriquecimiento, aislamiento poco sensible debido a la biota de origen presente en la materia prima, además se complementa con la identificación bioquímica y serológica, generando resultados falsos negativos en muestras con una alta carga microbiana que puede inhibir la presencia de *L. monocytogenes*.

Estudios previos han demostrado que *L. innocua* crece a una tasa mayor que *L. monocytogenes* en medios selectivos de enriquecimiento, y si *L. innocua* se encuentra en una proporción mayor que *L. monocytogenes*, puede inhibir su crecimiento durante el enriquecimiento inicial generando falsos negativos.

Los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de técnicas con mayor sensibilidad en la detección de patógenos asociados a alimentos; sin embargo, estas metodologías se han visto limitadas por varios factores que han hecho difícil su estandarización y uso de forma rutinaria. El principal obstáculo en la aplicación de la PCR para la detección de microorganismos presentes en los alimentos es la falta de método estandarizado de extracción a partir de diferentes matrices alimenticias. La presencia de compuestos propios del alimento (fenoles, glicógeno, grasas y otras sustancias orgánicas) pueden actuar como inhibidores de la reacción de amplificación y arrojar resultados falsos negativos (López y Mejía, 2012).

Los resultados obtenidos concuerdan con los informados por Araya *et al.*, (2008), quienes realizaron una investigación en la Universidad de Costa Rica durante el año

2006, donde también determinaron la ausencia de *L. monocytogenes* en un total de 25 muestras de leche cruda obtenida por ordeño manual y provenientes de cinco productores diferentes, aun cuando en el presente trabajo se duplicó el tamaño de muestra.

Al igual que en otras investigaciones realizadas en las lecherías de Guápiles, Limón y Moravía en San José de Costa Rica, por Ellner *et al.*, (1991), tampoco se logró aislar *L. monocytogenes*.

En otro estudio realizado por Mayorga (2004), en la provincia de Cautín, Chile, tampoco se determinó la presencia de este patógeno en leche cruda almacenada en tanques de enfriamiento de 33 establos.

En Canadá y EUA, diversos estudios indican que la prevalencia de *L. monocytogenes* en leche y productos lácteos varía desde 0 al 12% (Pitt, *et al.*, 1999). Reuben y col. mencionan una prevalencia del 5.4% en Canadá (Morales, *et al.*, 1995), sin embargo, en México no se tiene información (Rodríguez, *et al.*, 2009).

En otro estudio, Díaz y colaboradores (2012), además de buscar la presencia de *L. monocytogenes* en leche fresca, también investigaron otros microorganismos de importancia sanitaria, de donde se pudo aislar *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, lo que indica la baja calidad sanitaria

de la leche y el alto grado de contaminación microbiológica. El bajo número de *L. monocytogenes* junto con el alto número de otros microorganismos presentes en la leche fresca, hace más difícil su aislamiento por ser ésta una bacteria que se encuentra en bajas proporciones y finalmente se inhibe frente a otros microorganismos, ya sea por la competencia de nutrientes o por la producción de bacteriocinas con acción bactericida o bacteriostática (Díaz *et al.*, 2012).

## 8.0 CONCLUSIÓN

En México, los estudios epidemiológicos sobre la incidencia y formas clínicas de la listeriosis y sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos son escasos.

En la literatura consultada, no fue posible obtener datos sobre la incidencia de este microorganismo, ya que en los procesos gastroentéricos por *L. monocytogenes* no se declaran, o bien son incluidos en otros procesos diarreicos por no seguirse su análisis en forma rutinaria.

Hasta el momento la listeriosis no ha sido un problema de Salud Pública en el sitio donde se obtuvieron las muestras, sin embargo, a pesar de que en el presente trabajo no se logró aislar *L. monocytogenes* en leche bronca, ni en quesos artesanales, no se puede descartar su presencia definitiva ya que se trata de una bacteria ubicua, por lo tanto, no deja de ser una alerta a la población, ya que el consumo de quesos artesanales y de leche bronca en estos municipios, es una práctica cotidiana, por lo tanto son un riesgo para la Salud Pública.



## REFERENCIAS

1. Agudelo, D. y Bedoya, O. (2005) Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista Lasa-llista de Investigación*. 2(1):38-42.
2. Albarracin, C. Poutou, P. Carrascal, C. (2008) *Listeria* spp. and *L. monocytogenes* in raw goat's milk. *Revista MVZ Córdoba* 13(2):1326–1332.
3. Álvarez-Fuentes, G. Herrera-Haro, J. Alonso-Bastida, G. Barreras-Serrano, A. (2012) Calidad de la leche cruda en unidades de producción familiar del sur de Ciudad de México. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 44: 237-242.
4. ANMAT. (2011) Análisis microbiológicos de los alimentos. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis\\_microbiologico\\_de\\_los\\_alimentos\\_Vol\\_I.pdf](http://www.anmat.gov.ar/renaloe/docs/Analisis_microbiologico_de_los_alimentos_Vol_I.pdf) [Citado: 10/02/18].
5. Araya, V. Gallo, L. Quesada, C. Chaves C, Arias M. (2008) Evaluación bacteriológica de la leche y queso de cabra distribuidos en el Área Metropolitana de San José, Costa Rica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. 58(2): 182-186.
6. Barbau-Piednoir, N. Botteldoorn, M. Yde, J. Mahillon, N.H. Roosens.(2012). Development and validation of qualitative SYBR® Green real-time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* *Applied Microbiology and Biotechnology* pp. 1-17.
7. Becerra, María. (2013) Detección de *Listeria monocytogenes* en queso cotija artesanal madurado. Tesis licenciatura. México. Universidad Nacional Autónoma de México.
8. Brooks, G. Butel, S. Morse, S. (2010) *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 25a ed. México: Mc. GRAW HILL.

9. Cabrera, María. Valladares, Priscila. (2016) Determinación de *Listeria* spp. mediante PCR en Tiempo Real en muestras de leche cruda, recolectadas en la provincia de Pichincha. Tesis licenciatura. Ecuador, Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito.
10. Castañeda-Ruedas, G. Eslava-Campos, C. Castro-del Campo, N. León-Felix, J. Chaidez-Quiroz, C. (2014) Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública. Mex.* 56(6): 654-659.
11. Castillo, G. y Segura, F. (2015) Evaluación in vitro de un suplemento alimenticio comercial que contiene *Bacillus coagulans* como probiótico para el tratamiento preventivo de listeriosis. Tesis licenciatura, Universidad de El Salvador.
12. CDC. (2002) Electron micrograph of a flagellated *Listeria monocytogenes* bacterium. Foto tomada por: Elizabeth White. Disponible en: <https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=2287> [Citado: 30/05/17].
13. CDC. (2012) Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Imported Frescolina Marte Brand Ricotta Salata Cheese (Final Update), 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-09-12/index.html> [Citado: 30/06/17].
14. CDC. (2013) Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Crave Brothers Farmstead Cheeses (Final Update), 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-07-13/index.html> [Citado: 30/06/17].
15. CDC. (2014) Oasis Brands, Inc. Cheese Recalls and Investigation of Human Listeriosis Cases (Final Update), 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/cheese-10-14/index.html> [Citado: 30/06/17].

16. CDC. (2016) Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Raw Milk Produced by Miller's Organic Farm in Pennsylvania (Final Update), 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/raw-milk-03-16/index.html> [Citado: 30/06/17].
17. CDC. (2017) Listeriosis. General Information. Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027 USA. Disponible en: <https://www.cdc.gov/spanish/listeria/index.html> [Citado: 30/06/ 17].
18. CDC. (2017) Multistate Outbreak of Listeriosis Linked to Soft Raw Milk Cheese Made by Vulto Creamery (Final Update), 1600 Clifton Road Atlanta, GA 30329-4027EE.UU. Disponible en: <https://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/soft-cheese-03-17/index.html> [Citado: 25/07/17].
19. Chavarrías, M. (2006) Zoonosis y seguridad alimentaria. Boletín semanal. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/2006/04/13/23165.php> [Citado: 12/04/17].
20. Contreras, L. Ruiloba de León, S. González, G. Espinosa, M. y Rodas-Suarez, O. (2016) Análisis del gen *hly* para la detección rápida de *Listeria monocytogenes*. XX Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica. XIV Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. Veracruz- México. Disponible en: <http://studyres.es/doc/1160672/an%C3%A1lisis-del-gen-hly-para-la-detecci%C3%B3n-r%C3%A1pida-de?page=1> [Citado: 15/01/2018].
21. Den Bakker, H. Warchocki, S. Wright, E. Allred, A. Ahlstrom, C. Manuel, C. Stasiewicz, M. Burrell, A. Roof, S. Strawn, L. Fortes, E. Nightingale, K. Kephart, D. Wiedmann, M. (2014) *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:1882–1889.

22. Díaz, M. Chávez, M. Saucedo, E. (2012) *Listeria monocytogenes* en leche y queso fresco como vehículo transmisor de listeriosis humana en la provincia de Trujillo, Perú. Revista Ciencia y Tecnología. Vol. 9(2):23-38.
23. Domínguez, Carla. (2014) Efecto de la refrigeración y la aplicación de ácido láctico sobre la presencia de *Listeria monocytogenes* en canales bovinas en un centro de beneficio de Lima - Perú. Tesis licenciatura. Perú. Universidad Nacional Mayor De San Marcos.
24. Ellner, R. Utzinger, D. García, V. (1991) Aislamiento de *Listeria* spp. de diversos alimentos en Costa Rica. Rev. Cost. Cienc. Méd., Vol. 12(3-4): 33-39.
25. Espinosa, Levi (2015) Evaluación Sanitaria De Queso Fresco Artesanal En El Ejido Chihuahua, La Trinitaria, Chiapas. Tesis licenciatura. Chiapas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna División Regional De Ciencia Animal.
26. FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2015) Producción lechera. Disponible en: <http://www.fao.org/agriculture/dairygateway/produccionlechera/es/#.VLk4NdKUcsc> [Citado: 14/04/17].
27. FAO. Food and Agricultura Organization. 2017. Peligros para la Salud. Disponible en: <http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/leche-y-productos-lacteos/peligros-para-la-salud/es/#.WQLZ19J97IU> [Citado: 14/05/17].
28. Gallardo, J. (2016) Caracterización fenotípica de *Listeria monocytogenes* aislados de superficie donde se expende pollo y de alimentos de los mercados de la ciudad de Trujillo, Perú 2012. Tesis de maestría. Trujillo (PE): Universidad Nacional De Trujillo Escuela De Postgrado.

29. González- Zorn B. Suárez-Rodríguez, M. (s.d.) (2009) *Listeria* y *Listeriosis*. Revista Seguridad Alimentaria. Universidad Complutense de Madrid.
30. Guenther, S. Huwyler, D. Richard, S. Loessner, J. (2009) Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods. *Applied and Environmental Microbiology* 75(1): 93–100.
31. Hitchins, A. Jinneman, K. (2011) Chapter 10, Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods. US Food and Drug Administration's Bacteriological Analytical Manual (via web). Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm> [Citado: 2/07/17].
32. Instituto de Información e Investigación Geográfica, Estadística y Catastral Del Estado de México. Estadística básica municipal Tecámac. Estado de México, 2013.
33. Instituto Nacional de Salud. (2011) Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en queso fresco en Colombia, Bogotá, pp. 10,15.
34. Jayarao, B. M. Donaldson, S. C. Straley, B. A. Sawant, A. A. Hegde, N. Brown, J. L. (2006) A survey of foodborne pathogens in bulk tank milk and raw milk consumption among farm families in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 89: 2451–2458.
35. Kopper, G. Calderón, G. Schneider, S. Domínguez, W. Gutiérrez, G. (2009) Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico. Estudios de caso en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras y Nicaragua. Informe técnico sobre ingeniería agrícola y veterinaria n° 6. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
36. López, L. y Mejía, C. (2012) Evaluación de métodos de extracción de ADN para detección de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. *Revista MVZ Córdoba*: 17(3) 3.

37. López, V. Suárez, M. Chico, I. Navas, J. Martínez- Suárez, J.V. (2006) *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? Revista Argentina de Microbiología 38: 46-56.
38. Martínez, A. Villoch, A. Ribot, A. y Ponce, P. (2013) Evaluación de la calidad e inocuidad de quesos frescos artesanales de tres regiones de una provincia de Cuba. Revista de Salud Animal, 35(3), 210-213. [Citado: 04 de Julio de 2017]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0253-570X2013000300011&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2013000300011&lng=es&tlng=es).
39. Mayorga, M. (2004) Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda de tanques de frío en lecherías y tanques comunitarios provenientes de 9 sectores de la provincia de Cautín, IX Región. Tesis licenciatura. Universidad Católica de Temuco, Cautín.
40. Mejía, María. (2014) Detección de *Listeria monocytogenes* en Queso fresco por PCR Múltiple. Tesis licenciatura. CDMX. Universidad Nacional Autónoma De México.
41. Mesa, Nidia. (2016) Estrategias para minimizar los riesgos asociados a *Listeria monocytogenes* en el procesamiento de leche pasteurizada. Monografía para optar al título de Especialista en Procesos de Alimentos y Biomateriales. Bogotá. Universidad Nacional Abierta y A Distancia - Unad Escuela De Ciencias Básicas, Ingeniería Y Tecnología Especialización En Ingeniería De Procesos De Alimentos y Biomateriales.
42. Morales, L. De La O, A. Vázquez-Sandoval, M. Barbosa, R. (1995) Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, México. J Food Prot; 58:1139-1141.

43. Muñoz, A. B. Chaves, J. A. Rodríguez, E. C. y Realpe, M. E. (2013) *Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria. *Biomedica*, 33 (2), 283-291.
44. Murray, P. Rosenthal, K. Kobayashi, G. Pfaller, M. (2006) *Microbiología Médica*. 5ª ed., Elsevier Science, Barcelona.
45. Neogen Corporation. Caldo De Enriquecimiento Para *Listeria* Uvm Modificado. Disponible en: [http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia\\_pi/7409\\_sp\\_pi.pdf](http://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7409_sp_pi.pdf). [Citado: 29/11/17].
46. NicAogain, K. and C.P. O'Byrne. (2016) The Role of Stress and Stress Adaptations in Determining the Fate of the Bacterial Pathogen *Listeria monocytogenes* in the Food Chain. *Frontiers in Microbiology* 7:1865.
47. Nieto, Raúl. (2017) Presencia de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso fresco y leche, por pruebas microbiológicas y moleculares, provenientes de puntos de venta del Estado de México e Hidalgo. Tesis de licenciatura. México, Universidad Nacional Autónoma de México.
48. Noriega, L. M. Ibáñez, S. González P. Yamamoto, M. Vial, P. (2008) *Listeria monocytogenes*: Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. *Revista Chilena de Infectología* 25: 343-350.
49. 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.
50. NORMA Oficial Mexicana. NOM-143-SSA1-1995, Método de prueba microbiológico para alimentos, determinación de *Listeria monocytogenes*.

51. NORMA Oficial Mexicana. NOM-210-SSA1-2014, Productos y servicios. Métodos de prueba microbiológicos. Determinación de microorganismos indicadores. Determinación de microorganismos patógenos.
52. Norrung, B. Kirk, J. Buncic, S. (2009) Main concerns of pathogenic microorganisms in meat. En: Toldra F. ed. Safety of Meat and Processed Meat. Ed. Springer. p 3-30. [Citado: Julio 2015] Disponible en URL: [goo.gl/Y4sVJv](http://goo.gl/Y4sVJv)
53. OIE 2013. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres 2013. Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea> [Citado: 14/01/18].
54. Organización Mundial de la Salud (OMS). (2015) Enfermedades de transmisión alimentaria. Disponible en: [http://www.who.int/topics/foodborne\\_diseases/es/](http://www.who.int/topics/foodborne_diseases/es/) [Citado: 12/04/17].
55. Orsi, R. y Wiedmann, M. (2016) Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:5273–5287.
56. Ortiz-Jareño, M. (2016) Diversidad genética y persistencia ambiental de *Listeria monocytogenes* en dos plantas de procesamiento de carne de cerdo ibérico: influencia de la resistencia a desinfectantes de amonio cuaternario. Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid.
57. Palomino-Camargo, C. E. y González- Muñoz, Y. (2014) Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: Ventajas y limitaciones. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública*, 31(3), 535-546.
58. Paguay, T. y Coronel, Ángel. (2015) Determinación de la incidencia de adulterantes e inhibidores de leche cruda almacenada en diez centros de acopios de la provincia



- Azuay. Tesis licenciatura. Ecuador, Universidad de Cuenca; Facultad de ciencias agropecuarias carrera de medicina veterinaria y zootecnia.
59. Pérez, N.L. y Sigaran, P.M. (2012) Determinación de la resistencia en cepas de *Listeria monocytogenes* aislada a partir de muestras de espinaca *Spinacea oleracea* utilizando germicidas para la desinfección de alimentos. Tesis de Licenciatura, Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia, El Salvador.
60. Pitt .W. Harden, T. Hull, R. (1999) *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Australian J Dairy Technol.; 54:49-65.
61. Ramaswamy, V. Cresence, M. Rejitha, J. Lekshmi, U. Dharsana, S. Prasad, P. Vijila, M. (2007) J Microbiol Immunol Infect 40:4–13.
62. Ramírez, G.R. Torres, L.G., Henao, J. M. y Peña, C. (2013) Diagnóstico de *Listeria monocytogenes* mediante qPCR. Grupo de Investigaciones en Ciencias de los Animales. 1-16.
63. Reuben, A. Treminio, H. Arias, L. Cháves, C. (2003) Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica. Arch Latinoam Nutr.; 53:389-392.
64. Reyes, J.E. García, M.G. Hernández, L.A. (2011) Aplicación de los conceptos de inocuidad en la producción de leche en Sinaloa. Fundación PRODUCE, SAGARPA, Gobierno del Estado de Sinaloa.
65. Rivera, A. Vega, L. (2014) Valoración de la calidad de la leche procedente del centro de acopio “Esmilda Rizos” en el Municipio de El Sauce departamento de León durante el periodo marzo 2014 - mayo 2014. Tesis de licenciatura. León (Nic): Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua Unan – León.

66. Rodas-Suárez, O.R. (2009) Caracterización bioquímica y molecular de *Listeria monocytogenes*. Tesis para obtener el grado de Doctor en ciencias Biológicas. México, Universidad Autónoma Metropolitana.
67. Romero, CR. (2007) Microbiología y parasitología humana: bases etiologías de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. México: Medica Panamericana.
68. Rosas-Barbosa, B.T. Luis-Juan. Morales, A. la Alaniz-de, R.O. Ramírez-Álvarez, A. Soltero-Ramos, J.P. de la Mora-Quiroz, R. Martin, P. Jacquet, C (2014) Presence and persistence of *Listeria* in four artisanal cheese plants in Jalisco, Mexico. e-Cucba.; 2:3–37.
69. Rossi, L. Paiva, A. Tornese, M. Chianelli, S. Troncoso, A. (2008) Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. Revista Chilena de Infectología 25(5): 328-335.
70. Rodríguez, Ennis. Cabrera, Lilibeth. Colina, Gisela. (2009) *Listeria monocytogenes* en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad. NOVA - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas. Vol.7 No. 11:1-110.
71. Sánchez- Valdés, JJ., Colín -Navarro, V., López- González, F., Castelán -Ortega, N., Octavio, A., y Estrada- Flores, JG. (2016) Diagnóstico de la calidad sanitaria en las queserías artesanales del municipio de Zacazonapan, Estado de México. Salud Pública de México, 58(4), 461-467.
72. Schagat, T., Wiczorek, D., Helt, C., Smith, D., White, D. y Vincent, E. (2013) Comparing Manual and Automated Genomic DNA Purification Methods for Genotyping Arrays. Promega Corporation. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/resources/pubhub/comparing-manual-and-automated-genomic-dna-purification-methods-for-genotyping-arrays/>  
[Citado: 15/01/2018].

73. Schöbitz, R. Ciampi, L. Nahuelquin, Y. (2009) *Listeria monocytogenes*. Un peligro latente para la industria alimentaria. *Agro Sur*, Vol. 37(1): 1-8.
74. Secretaria De Salud. (2013) Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica. *Diario Oficial de la Federación*. México CDMX.
75. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2007). Acuerdo mediante el cual se enlistan las enfermedades y plagas de los animales, exóticas y endémicas de notificación obligatoria en los Estados Unidos Mexicanos. *Diario Oficial de la Federación*. México CDMX.
76. Sobarzo, Orlando. (2016) "Identificación por PCR de, *L. innocua* y *L. ivanovii* aisladas de Apio (*Apium graveolens*) expedido en Ciudad Obregón, Sonora". Tesis Licenciatura. México, Instituto Tecnológico de Sonora.
77. Solís-Méndez, A. Martínez-Loperena, R. Solorio-Sánchez, J. Estrada-Flores J. Avilés-Nova, F. Gutiérrez-Ibáñez, A. Castelán-Ortega, O. (2013) Characteristics of the tepeque cheese from "la tierra caliente" of the state of Michoacán: a cheese produced in an intensive silvopastoral system. *Trop Subtrop Agroecosystems* 16:201–214.
78. Soto -Varela, Z. Pérez -Lavalle, L. y Estrada- Alvarado, D. (2016) Bacteria causing of foodborne diseases: an overview at Colombia. *Revista Salud Uninorte*, 32(1), 105–122.
79. Todar, K. (2012) *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Disponible en: <http://www.textbookofbacteriology.net>. [Citado:29/11/17].
80. Torres, K.J. Sierra, S.C. Poutou, R.A. Vera, H. Carrascal AK. Mercado, M. (2005) Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *Revista MVZ Córdoba*; 10: 511-543.

81. Trujillo-Chávez, C.E. (2016) Análisis microbiológico y resistencia a antimicrobianos del queso fresco que se expende en el mercado de Santa Rosa, Ciudad de Riobamba. Tesis licenciatura. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba.
82. Vera, A. González, G. Domínguez, M. Bello, H. (2013) Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación.” Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation”. Rev chilena Infectol. 30(4): 407-416.
83. Vila, M. (2014) *Listeria monocytogenes* en comidas preparadas. Seguridad Alimentaria, (230), 69–77.
84. Vilchis, Rodolfo. (2016) Búsqueda del gen IIsX de la LIPI-3 en cepas invasivas de *Listeria monocytogenes*. Tesis licenciatura. México, Instituto Politécnico Nacional.
85. Villanueva- Durand, D. A. (2015) Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de quesos frescos procedentes de mercados del Cercado de Lima. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
86. Villanueva, M. (2010) Frecuencia de *Brucella spp*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157: H7 en quesos frescos sin pasteurizar colectados en la zona conurbada Veracruz- Boca del Río. Tesis de Maestría. Veracruz, Universidad Veracruzana.
87. Weller, D. Andrus, A. Wiedmann, M. den Bakker, H. (2015) *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. Int J Syst Evol Microbiol 65:286– 292.
88. Wen, J. Anantheswaran, R. Knabel, S. (2009) Changes in barotolerance, thermotolerance, and cellular morphology throughout the life cycle of *Listeria monocytogenes*. Appl Environ Microbiol. 75: 1581–8.

89. Zumbado, L. y Romero, Z. (2016) "Conceptos sobre inocuidad en la producción primaria de la leche". Revista Ciencias Veterinarias; 33: 51-56. Disponible en: <<http://www.revistas.una.ac.cr/index.php/veterinaria/article/view/7764>>.

[Citado: 12/12/ 17].

## Anexo uno



### UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

#### Cuestionario sobre hábitos de consumo de leche y derivados

**Nota:** En los espacios sombreados y en letras cursivas se señalan las instrucciones para el entrevistador.

**Presentación:** Me llamo (nombre del entrevistador) y pretendemos obtener información para un proyecto de Investigación a cargo de la UNAM. Queremos conocer sobre los hábitos de consumo de lácteos en la población de Hidalgo y México. Solicitamos su colaboración para contestar este cuestionario (5 minutos de su tiempo). La información que nos proporcione será confidencial y exclusivamente utilizada para fines de investigación.

#### O. INFORMACIÓN ADMINISTRATIVA *(Anote la información o rellene los círculos según corresponda)*

0.1 Folio del cuestionario <i>(no llenar)</i>	Número de folio: _____
0.2 Fecha de la entrevista	Fecha: / ___ / ___ / ___ / ___ / ___ / ___ / ___ / ___ / ___ / ___ / ___ Día Mes Año
0.3 Lugar donde se realiza la entrevista	<input type="radio"/> Centro de Salud <input type="radio"/> Otro <i>(especificar)</i> : _____ <input type="radio"/> Escuela _____

#### 1. DATOS GENERALES DEL ENTREVISTADO(A) *(Anote la información o rellene los círculos según corresponda)*

1.1 ¿Cuál es su estado civil?	<input type="radio"/> Soltero(a) <input type="radio"/> Casado(a) <input type="radio"/> Otro
1.2 ¿Cuántas personas viven en su casa?	Número: / ___ / ___ / <input type="radio"/> Vive solo(a)
1.3 ¿Usted tiene hijos?	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No
1.4 ¿Cuántos años tiene?	/ ___ / ___ / Años cumplidos
1.5 <i>Rellene según corresponda</i>	<input type="radio"/> Mujer <input type="radio"/> Hombre
1.6 ¿Cuál es su grado máximo de estudios?	<input type="radio"/> Primaria <input type="radio"/> Medio superior <input type="radio"/> Posgrado <input type="radio"/> Secundaria <input type="radio"/> Licenciatura <input type="radio"/> Otro: _____

#### 2. CONSUMO DE LECHE

2.1 ¿En su casa consumen leche de vaca?	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No
2.2 ¿De qué marca o tipo?	<input type="radio"/> De marca <input type="radio"/> Liconsa/Conasupo <input type="radio"/> Leche bronca <input type="radio"/> Otra: _____
2.3 ¿En qué sitios la compra?	<input type="radio"/> Tienda abarrotes <input type="radio"/> Supermercado <input type="radio"/> Minisuper <input type="radio"/> Cremería <input type="radio"/> Lechero/Botero <input type="radio"/> Otra: _____
2.4 ¿Qué cantidad de leche compra?	/ ___ / ___ / Litros de leche <input type="radio"/> Día <input type="radio"/> Semana <input type="radio"/> Mes

### 3. Contestar solo si se refiere el consumo de LECHE BRONCA...

3.1 ¿Hierve la LECHE BRONCA?	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	3.1.1 ¿Cuánto tiempo? _____
3.2 ¿Regularmente en cuántos días la consumen?	<input type="radio"/> El mismo día <input type="radio"/> De 2 a 3 días	<input type="radio"/> En una semana máximo. <input type="radio"/> Otro: _____
3.3 ¿Si no la consume el mismo día, la refrigera?	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	
3.4 ¿Qué lo(a) motiva a consumir leche bronca?	R. _____	
3.5 ¿Con que frecuencia la consume?	<input type="radio"/> Siempre <input type="radio"/> Ocasionalmente	
3.6 ¿En el último mes la consumió?	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	3.7 ¿En el último año la consumió?
	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No	

### 4. CONSUMO DE QUESO Y DERIVADOS

4.1 ¿Compra queso para el consumo familiar?	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No
4.2 ¿Qué tipo de quesos compra?	<input type="radio"/> Fresco (panela, canasto, blanco, ranchero) <input type="radio"/> Oaxaca <input type="radio"/> Otro tipo: _____
4.3 ¿De qué marca?	<input type="radio"/> Especifique marca _____ <input type="radio"/> Sin marca
4.5 ¿Qué cantidad de queso compra?	<input type="radio"/> ¼ kilo <input type="radio"/> Día <input type="radio"/> Semana <input type="radio"/> Mes <input type="radio"/> ½ kilo <input type="radio"/> Otra cantidad: _____
4.6 ¿Con qué frecuencia compra queso?	<input type="radio"/> Diario <input type="radio"/> Cada semana <input type="radio"/> Cada mes <input type="radio"/> ____ veces por semana <input type="radio"/> Cada quincena
4.7 ¿En qué sitios compra el queso?	<input type="radio"/> Tianguis <input type="radio"/> Tienda de abarrotes <input type="radio"/> Mercado <input type="radio"/> Supermercados <input type="radio"/> Otro: _____ <input type="radio"/> Cremería <input type="radio"/> Minisuper

### 6. INFORMACIÓN SOBRE SALUD PÚBLICA

6.1 ¿Sabía que por consumir leche bronca o quesos frescos puede contraer enfermedades?	<input type="radio"/> Si <input type="radio"/> No
6.2 ¿Sabe cuáles enfermedades?	
6.3 OBSERVACIONES:	

GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN