



# UNIVERSIDAD VERACRUZANA

---

---

**"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**

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIA ANIMAL**

PRESENTA:

**MAYRA VILLANUEVA VALENCIA**

Director Interno

DR. DAVID I. MARTÍNEZ HERRERA

Director Externo

DRA. AHIDE LÓPEZ MERINO

Co-Director

DR. ALVARO DE JESUS PENICHE CARDEÑA

VERACRUZ, VER.

SEPTIEMBRE 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."**

**POR**

**Mayra Villanueva Valencia**

**Tesis propuesta AL colégio de profesores Del posgrado  
De La**

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
De La**

**Universidad Veracruzana**

**Como requerimiento parcial para  
Obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**En**

**CIENCIA ANIMAL**

**SEPTIEMBRE 2010**

## CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
INSTITUCIONES DONDE SE DESARROLLO LA INVESTIGACIÓN.....	v
RECONOCIMIENTO DE BECA.....	vi
FUENTE DE FINANCIAMIENTO.....	vii
RECONOCIMIENTO.....	viii
INDICE.....	x
LISTA DE CUADROS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii

## DEDICATORIA

A **Dios** por acompañarme en todo momento de mi vida, por brindarme la fuerza necesaria en los momentos de tropiezo y por la fuerza para seguir levantando el rostro ante el mundo.

**A mis ANGELITOS. Por estar a mi lado en todo momento, por el amor que les tengo y espero me tengan.**

A **mis padres.** Gracias por compartir conmigo esta meta de mi vida, sin su apoyo, consejos y amor no hubiera sido posible; por todas las ausencias y por las noches de desvelo esperándome. Este triunfo también es de ustedes, porque son parte importante en mi vida tanto personal como académica. Los AMO.

A **mi hermana** por todo su amor y sus noches de medio dormir por estar al pendiente de mi, gracias.

A **Arturo.** Por el amor y la paciencia que me tienes, por lo momentos. Te AMO

A **la Familia Gutiérrez Gutiérrez.** Por todo su apoyo, por dejarme ser parte de su familia.

A **mi familia Silva Valencia.** Por todas las atenciones que tuvieron conmigo durante el desarrollo de mi trabajo en la ciudad de México, por su cariño y muchas cosas más.

A **Tía Rosy.** Por permitirme estar en su casa y en su familia durante mi estancia en México

A **Mayi, Lala, Toña, Julio Antonio, Mariana, Dari y a ti Abuelo** Por compartir su espacio conmigo.

## **A los chicos de maestría**

A Margarita !!!!!!!!!!!!!!! Por tu valiosa amistad, por los buenos ratos que pasamos juntas, en el laboratorio, en los cubículos y en muchas aventuras que no olvidaré.

Al club C.C. Por dejarme pertenecer a sus filas, brindarme su cariño, consejos amistad, abrirme las puertas de su casa. Por el solo hecho de ser y estar!!, gracias por existir en mi tiempo y espacio.

y por muchas cosas más GRACIAS MIL !!!!!!!!!!!!!!!.

A Pame. Por permitirme ser su amiga, por escucharme en mis buenos y muy malos ratos, por su disposición de apoyarme en toda ocasión.

A Juan José. Por todo el apoyo administrativo que siempre me brindó y por su amistad y confianza en mí como profesionista al ser mi donante de sangre preferido!!!!!!!!!!!!!!

A Ednita. Por darse el tiempo de conocerme y brindarme su amistad, por esos buenos ratos de chisme y cotorreo.

A Evelyn. Por su apoyo en el laboratorio y como compañera de clases.

## **A los brucellos:**

A Auris !!!!!!!!!!!!!!! Por ser hoy día una de mis más grandes y queridas amigas, por su apoyo en el trabajo de laboratorio, de redacción y corrección a esta investigación. No tengo como expresar lo gratificante que fue laborar a tu lado.

A Karellen !!!!!!!!!!!!!!! Por ser una amiga, por la confianza que me brindaste, por todos los buenos ratos que pasamos juntas y por supuesto por todos los chismes de campana !!

A Víctor. Por el apoyo que me brindó en el trabajo de laboratorio, por transmitirme de sus conocimientos.

## **A mis primos y sobrinos.**

A Benhadad. Por estar en todo momento pendiente de mí progreso académico y de su valioso apoyo durante esta etapa de mi vida, por su interés y cariño.

A Evet y Cecy. Porque en toda ocasión me dieron ánimo para seguir adelante.

A Cinthy. Por preguntar por mí en mi ausencia y desearme lo mejor en toda ocasión.

A Israel. Por su compañía y cariño, por ir por mí al metro cuando tuve miedo y por esas noches de cena y películas que no olvidaré.

A Oliver. Por existir y por su silencio lleno de palabras

A Tuti, Leonardo, Valeria, Isacc, Gaby, Evet Mariel, Daniela, Valeria y Cuchu por regalarme hermosas caritas de sonrisa que me ayudaron a pasar los malos ratos. Espero ser algún día inspiración para ustedes

## **A mis amigos**

Ezri. Por creer en mí y brindarme tu apoyo en todo momento, por todas esas veces que no llegué a las citas y aun así me sigues esperando.

A Sandra, Edgar, Ornelas, Javi y Jesús. Por permitirme ser parte de la lista de sus amigos, por dejarme ayudarles en lo que me es posible y principalmente por dejarme formar parte de sus vidas.

A los morlock´s por todas las porras y confianza, por dejarme ser su LIDER !!!!!!!!!!!!!!!

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE EN EL CAMINO SE QUEDARON, GRACIAS

Esta tesis se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Veracruzana en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia bajo la supervisión del Dr. David I. Martínez Herrera, en el laboratorio de Microbiología General de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional bajo la supervisión de la Dra. Ahidé López Merino, en el laboratorio de Diagnóstico del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias bajo la supervisión del Dr. José Francisco Morales Álvarez, en el laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias bajo la supervisión del Dr. Jesús Vázquez Navarrete.

**Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.** Por el apoyo financiero otorgado durante mi formación profesional con número de becario 216847.



## **FUENTE DE FINANCIAMIENTO**

Fondos Sectoriales CONACYT – SAGARPA y forma parte del proyecto “Estudio comparativo de la eficiencia de la cepa RB51 y cepa 19 para prevenir la brucelosis en hatos con diferentes condiciones sanitarias” (SAGARPA – CONACYT – 2004-23), bajo la responsabilidad del Dr. Ricardo Flores Castro.

## **RECONOCIMIENTOS**

**A la Universidad Veracruzana.** Por ser la casa que me abrió sus puertas para mi formación profesional.

**Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.** Por brindarme un espacio que me permitiera cumplir la meta de estudiar una maestría

**Al Dr. David I Martínez Herrera.** Gracias por la oportunidad de ser su estudiante de maestría, por todos los consejos, las experiencias y principalmente por la paciencia que me tuvo.

**A la Dra. Ahide López Merino.** Por todo su invaluable apoyo desde el primer momento y GRACIAS por dejarme ser parte de su equipo de trabajo.

**Al Dr. Alvaro Peniche Cardeña.** Por todo los momentos que me dedicó, así como sus consejos y paciencia.

**A mi comité tutorial Dra. Violeta Pardo Sedas, Dra. Dora Romero Salas y al Dr. David I. Martínez Herrera.** Gracias por todos sus consejos y observaciones para bien, realizadas a esta investigación y a mi persona.

**A los miembros de mi jurado. Dra. Violeta Pardo Sedas, Dra. Dora Romero Salas y al Dr. Ricardo Flores Castro.** Por honrarme al ser revisores de esta investigación.

**A la M. en C. Laura Quintero.** Por todo el apoyo académico y personal que me dió durante la realización de este trabajo de tesis.

**Dr. Jesús Vázquez Navarrete.** Por transmitirme sus conocimientos y permitir mi estancia en su laboratorio, así como el apoyo incondicional que me mostró en toda ocasión.

**Dra. Araceli Contreras Rodríguez.** Por toda la atención brindada en mi estancia en el IPN, por su paciencia y transmisión de conocimientos.

**A la M. en C. Aurora Parissi Crivelli.** Por todo el apoyo que me ha brindado en toda ocasión.

**A mis Profesores de Posgrado.** Por la enseñanza no solo académica sino de experiencia como investigadores, profesionales y personas.

## INDICE

INTRODUCCION.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Historia del queso.....	3
1.2 Clasificación de los quesos.....	3
1.3 Quesos en México .....	4
1.4. Elaboración de quesos.....	4
1.5 Quesos frescos.....	5
1.6 Microorganismos patógenos del queso.....	6
1.6.1 Generalidades de <i>Brucella</i> spp.....	6
1.6.1.1 Epidemiología.....	8
1.6.1.2 Patogenia.....	9
1.6.1.3 Cuadro clínico en el humano.....	10
1.7 Generalidades de <i>Listeria</i> spp.....	12
1.7.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
1.7.1.1 Epidemiología.....	14
1.7.1.2 Patogenia.....	15
1.7.1.3 Patología en el humano.....	17
1.8 Generalidades de <i>Escherichia coli</i> .....	18
1.8.1 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (O157:H7).....	20

1.8.1.1 Epidemiología.....	22
1.8.1.2 Patogenia.....	23
1.8.1.3 Sintomatología en el humano.....	24
1.9 Métodos Diagnósticos.....	25
1.9.1 Aislamiento bacteriológico.....	25
1.9.1.1 <i>Brucella</i> spp.....	25
1.9.1.2 <i>Listeria</i> spp.....	26
1.9.1.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	27
1.10 Pruebas moleculares.....	28
1.10.1. <i>Brucella</i> spp.....	28
1.10.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	29
1.10.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	30
HIPÓTESIS.....	31
OBJETIVOS.....	32
General.....	32
Específicos.....	32
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.1 Localización.....	33
2.2 Diseño experimental y tamaño de muestra.....	33
2.3 Cepas de Referencia.....	34
2.4 Recolección de Muestras.....	34
2.5 Procesamiento de las Muestras.....	35

2.5.1 Métodos Bacteriológicos.....	35
2.5.1.2. <i>Brucella</i> spp.....	36
2.5.1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	36
2.5.1.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	37
2.5.2 Métodos Moleculares.....	37
2.5.2.1 Extracción de DNA.....	37
2.5.2.2 Método a partir de muestras.....	38
2.5.2.3 Método a partir de cultivo.....	38
2.5.3 Procedimiento de PCR.....	39
2.5.3.1 <i>Brucella</i> spp.....	39
2.5.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	40
2.5.3.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	40
2.5.4 Gel de agarosa.....	41
2.6 Análisis estadístico.....	41
3.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
3.1 Localización del área de estudio.....	42
3.2 Aislamiento e identificación microbiológica.....	44
3.2.1 <i>Brucella</i> spp.....	44
3.2.3 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	46
3.2.4 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	52
3.3 Identificación del microorganismo por PCR.....	57
3.3.1 <i>Brucella</i> spp.....	57

3.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	60
3.3.3 <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	61
CONCLUSIONES.....	65
REFERENCIAS.....	67

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Aislamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 en muestras de queso por mercado y época del año.....	56
---	----



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de los mercados utilizaos en el estudio.....	42
Figura 2. Municipios de procedencia de los quesos que se expenden en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río.....	44
Figura 3. Aislamiento de <i>Listeria</i> spp. del total de quesos analizados.....	47
Figura 4. Identificación de <i>L. monocytogenes</i> a partir de los aislados de <i>Listeria</i> spp.....	48
Figura 5 a). Sinergismo de cepas de <i>Listeria monocytogenes</i> en CAMP.....	49
Figura 5 b). Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> en medio Oxford.....	49
Figura 6. Aislamiento de <i>Listeria monocytogenes</i> por época del año.....	51
Figura 7. Identificación de cepas de <i>E. coli</i> con antígeno somático.....	52
Figura 8. Aislamiento de <i>E. coli</i> O157:H7 por época del año estudiada.....	55
Figura 9. Electroforesis de amplificadas de <i>Brucella</i> spp.....	57
Figura 10. Electroforesis de amplificadas de <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	62

## RESUMEN

Villanueva Valencia, Mayra MCA Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia U.V. Septiembre 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"**. Dr. David I. Martínez Herrera, Dr. Alvaro Enrique de Jesús Peniche Cardeña, Dra. Ahidé López Merino.

El queso fresco desde sus inicios se elabora con leche sin pasteurizar lo que, junto con los procesos de manufactura, favorecen la presencia de microorganismos patógenos para el humano, que pueden provenir de la leche misma o ser contaminantes de la cadena de producción como lo son *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7, entre otros. Debido a lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7 en quesos frescos no pasteurizados, por medio de técnicas bacteriológicas convencionales y moleculares de PCR. Para ello, se recolectaron 30 muestras en los mercados Abastos Boticaria, Malibrán, hidalgo, Unidad Veracruzana, Zaragoza ubicados en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río en las temporadas de estiaje y lluvias. Por bacteriología no se aisló *Brucella* spp., para *Listeria monocytogenes* se obtuvo el 1.6% (IC<sub>95%</sub>: 0.09-10.14) en la temporada de estiaje y para *Escherichia coli* O157:H7 fue 15% (IC<sub>95%</sub>: 4.5-27.08), con aislamientos en ambas temporadas. Por PCR se identificaron cuatro cepas de *Brucella* spp., (6.67%; IC<sub>95%</sub> 2.16-17.01) dos en la temporada de estiaje y dos en la de lluvias; de *Listeria monocytogenes* no se obtuvieron amplificadas y para *Escherichia coli* O157:H7 sólo una de las cepas aisladas (11.11%; IC<sub>95%</sub>: 0.58-49.33) amplificó para la Verotoxina 2, la cual correspondió a la temporada de estiaje. No se encontraron diferencias significativas (P>0.05) entre ambas temporadas. Los resultados obtenidos indican que el empleo de técnicas bacteriológicas convencionales y moleculares permiten establecer la presencia de bacterias patógenas en quesos; sin embargo, ambas presentan limitantes para su uso como son la cantidad de unidades formadoras de colonias (UFC) suficientes para el aislamiento o de iniciadores bien estandarizados para PCR que identifiquen más de una característica del microorganismo en estudio. La identificación de *Listeria monocytogenes* por PCR no resultó de utilidad.

## ABSTRACT

Villanueva Valencia, Mayra MCA Faculty of Veterinary Medicine and Zootecnia U.V. "***Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* AND *Escherichia coli* O157:H7 FREQUENCY FROM NON PASTEURIZED FRESH CHESES COLLECTED IN VERACRUZ – BOCA DEL RIO METROPOLITAN AREA**". Dr. David I. Martinez Herrera, Dr. Alvaro Enrique de Jesus Peniche Cardeña, Dr. Ahide Lopez Merino.

In Mexico fresh cheese always has been made with non pasteurized raw milk and along with manufacture process, presence of pathogen microorganisms are enhanced; thus they could proceed from the raw milk or as contaminants in the production chain, such as *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7, among others that have been related with fresh cheese consumption. The aim of the study was to determine *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 presence in non pasteurized fresh cheeses using conventional bacteriological and molecular procedures as polymerase chain reaction (PCR). In order to achieve this objective, 30 fresh cheese samples were collected from equal cheese establishments at markets from Abastos Boticaria, Malibrán, Hidalgo, Unidad Veracruzana and Zaragoza markets located at the metropolitan area in Veracruz and Boca del Río municipalities in Veracruz State of Mexico in drought and rain seasons. None *Brucella* spp. was isolated by conventional bacteriological procedures, but *Listeria monocytogenes* was isolated in 1.6% (CI<sub>95%</sub>: 0.09–10.14) of cheese samples in drought season and *Escherichia coli* O157:H7 in 15% (CI<sub>95%</sub>: 4.5–27.08) from both seasons. Using PCR *Brucella* spp. was identified in 4/60 cheese samples (6.67%; CI<sub>95%</sub>: 2.16–17.01), two in drought and the other two in rain season; none DNA amplified was obtained for *Listeria monocytogenes* and for *Escherichia coli* O157:H7 only one of nine isolated strains amplified DNA for Verotoxin 2 (11.11%; CI<sub>95%</sub>: 0.58–49.33) that corresponded to drought season. There were not significant differences ( $P > 0.05$ ) among seasons. Obtained results show that both, conventional bacteriological and molecular procedures are suitable to establish the presence of pathogenic bacteria in fresh cheeses; however, both procedures showed that are limitative to be used alone due to colony forming units (CFU) available to be enough for isolation or well standardized primers for PCR that allow to identify more than one characteristic in the studied microorganism. Identification of *Listeria monocytogenes* by PCR was not suitable.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se ha incrementado el interés por el consumo de alimentos de calidad, por lo que diferentes organizaciones internacionales, trabajan para procurar la inocuidad de los alimentos, entendida como "la propiedad de los alimentos para no causar daño a la salud pública" (Sóstenes y Martínez 2006). A nivel mundial se han aumentado las enfermedades transmitidas por alimentos, conocidas como "ETA" (Pietro, 2004). Las autoridades responsables a nivel estatal para el control de la inocuidad en alimentos en México son la Secretaría de Salud (SSA) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), ésta última hoy en día cubre el 100% de la producción y procesamiento primario, mientras que la SSA es responsable de los aspectos de inocuidad a través de la Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), quien posee la facultad de establecer estrategias para la protección contra riesgos sanitarios (Flores y Vélez, 2002).

Los alimentos como mariscos, vegetales, carnes rojas y blancas, leche y sus derivados están involucrados en la transmisión de enfermedades, por microorganismos contaminantes como *Escherichia coli* O157:H7 y otros coliformes fecales, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* tipo emético, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Shigella* sp., *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, entre otras (González y Rojas, 2005).

En ocasiones el origen, la fabricación de algunos alimentos así como sus características propias y de almacenamiento, favorecen la presencia de

microorganismos patógenos, como ocurre con el queso fresco que se elabora con leche no pasteurizada; todo ello, favorece la transmisión de enfermedades al humano (González y Rojas, 2005; Moreno *et al.*, 2007).

En México, la elaboración de quesos está regulada por la NOM-121-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS. ESPECIFICACIONES SANITARIAS, que tiene como finalidad regular la producción de alimentos de calidad para ser consumidos y exportados; para ello, se condicionaron los productos que deben ser empleados en la preparación de los quesos; asimismo, la norma indica los microorganismo que pueden estar presentes y los que deben estar ausentes en 25 g del queso en un proceso de análisis microbiológico (SSA, 1996a).

Desde el punto de vista de la inocuidad alimentaria, los quesos que se comercializan en el país, deberían carecer de patógenos; sin embargo, se reconoce a este producto como la principal causa de los casos de brucelosis humana a nivel nacional e internacional (Memish y Balkhy, 2004). En este sentido, también se ha reportado la presencia de *Listeria monocytogenes* (Manzano *et al.*, 1997) y de *Escherichia coli* O157:H7, como patógenos encontrados en quesos (Franco *et al.*, 2001).

En el estado de Veracruz se carece de información relacionada con la posible contaminación de los quesos por estos microorganismos; no obstante, en el año 2009 se reportaron 15 casos de brucelosis humana asociada al consumo de alimentos. Por otra parte, para *E. coli* O157:H7 no existe evidencia de su presencia en la entidad; no así para *Listeria monocytogenes* que ya ha sido identificada en el país (Saltijeral *et al.*, 1999), aunque no en el estado. Por lo que la finalidad de esta investigación fue identificar la presencia de estos microorganismos en los quesos que se consumen en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río.

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Historia del Queso**

A través de diversos textos antiguos se tiene conocimiento que el origen del queso se remonta a la época de los sumerios, pueblo que habitaba en la llanura comprendida entre los ríos Tigris y Eúfrates (actual sur de Irak) hace unos 5,000 años; esta población, tenía alrededor de 20 variedades de quesos blandos y contaban con una industria lechera bien organizada (Robinson y Wilbey, 2002; Licata, 2008); sin embargo, otros autores y escritos de la literatura antigua como el viejo testamento entre otros, mencionan que los inicios en la elaboración del queso se remontan al año 10,000 a. C. al lograrse la domesticación de ovejas y cabras (Juárez, 2008).

En la actualidad la FAO/OMS, define al queso como el producto fresco o madurado obtenido por la coagulación y separación del suero de la leche, nata o leche parcialmente desnatada (Vargas *et al.*, 2008).

### **1.2 Clasificación de quesos mexicanos**

Los quesos mexicanos se clasifican en tres categorías (Santos, 2006; Juárez, 2008): a) por su tipo de pasta, en Hilada (Oaxaca, Asadero), Rallable (Añejo, Cotija), Untable (Doble crema) y Tajable (Chihuahua, Manchego); b) por la consistencia de la pasta en Blanda (Doble crema), Semidura (Manchego y Chihuahua) y Dura (Añejo y Cotija) y, c) por grado de maduración en Fresco (Panela, Ranchero, Crema), medianamente maduros (Manchego Chihuahua) y fuertemente maduros (Añejo, Cotija).

### **1.3 Quesos en México**

En el país, se considera que la elaboración de este tipo de productos data de la época de la colonia, desde que los españoles introdujeron al ganado y con ello el desarrollo de la ganadería; no obstante, se carece de documentos escritos que avalen esta hipótesis, debido a que la principal forma de transmisión de este conocimiento es verbal y generacional por tradición. En la actualidad, para su elaboración se emplean procedimientos técnicos especializados y con alguna influencia extranjera; como sucede con el queso tipo Chihuahua, Oaxaca y el asadero (PROFECO, 2000).

No se tiene un registro exacto de la diversidad de quesos que se elaboran en el país, pero se consideran entre 20 y 35 diferentes variedades, que en su mayoría se manufacturan a partir de leche sin pasteurizar. A nivel nacional, y en particular en las zonas del trópico húmedo y seco, donde se localizan los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz, tradicionalmente predomina la elaboración de quesos con leche cruda o bronca y comparten características en el contenido de sal y la acidez de sus pastas (Juárez, 2008).

### **1.4 Elaboración de quesos**

El proceso de elaboración de quesos consta de cuatro pasos esenciales: la coagulación de la leche, la deshidratación del cuajo, el salado y la maduración; para esta última etapa, se requiere de un lapso de tiempo que puede variar de días a meses, pero siempre bajo un control estricto del ambiente. Según las condiciones requeridas durante su elaboración este último proceso dará al queso características organolépticas particulares tales como olor, sabor, color y textura (Chamorro y Losada, 2002; Santos, 2006).

## 1.5 Quesos frescos

Los quesos frescos contienen una alta proporción de humedad (60 a 80%), en comparación con otras variedades; presentan un aroma característico, sabor suave, brinda un aporte nutrimental por su contenido de calcio, vitamina A y proteínas; sin embargo, su vida de anaquel es corta (Santos, 2006).

En el país se han identificado un gran número de pequeñas empresas cuyos procesos de elaboración de quesos son artesanales; sin embargo, la mayor producción está dada por las grandes empresas de marcas reconocidas, quienes contribuyen con más del 60% del total de la producción anual en el país. Para el año 2009 se obtuvo una producción total nacional de 3,585 toneladas de quesos frescos (INEGI, 2010).

El proceso de elaboración del queso en México está sujeto a normatividad sanitaria para evitar su manufactura a partir de leche sin pasteurizar; no obstante, durante su procesamiento no se cumple con las normas establecidas, entre las que se encuentra la NOM-121-SSA1-1994, que establece las especificaciones sanitarias y microbiológicas para la elaboración de quesos frescos, maduros y procesados con la finalidad de prevenir infecciones alimentarias. La norma de referencia es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional, así que todas aquellas personas físicas o morales que se dediquen al proceso o importación de este alimento deberán observar lo referente a lo que establece en relación al número de bacterias detectables en 25 g del producto y las que no deben ser identificadas (SSA, 1996; Vargas *et al.*, 2008).

A pesar de la normatividad sanitaria existente en el país para el control de la inocuidad durante la elaboración del queso la práctica cotidiana de manufactura del mismo con leche cruda, se debe a la idea arraigada de que los quesos fabricados a partir de leche pasteurizada, cambian el sabor característica y la textura del producto; para demostrar esto, en España se realizó un estudio en el cual, se determinó que los cambios de sabor se dan por la presencia de bacterias de los géneros *Lactobacillus*,



*Propionibacterium* y *Enterococcus*, presentes en quesos no pasteurizados (González *et al.*, 2004).

## **1.6 Microorganismos patógenos del queso**

Debido a procesos de elaboración de productos lácteos sin pasteurizar y a la baja calidad durante su fabricación, se favorece la presencia de microflora contaminante entre las que se han identificado bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp., *Brucella* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*; es importante señalar que algunas de éstas bacterias se asocian como causantes de infecciones propias en el ganado que pueden ser eliminadas y pasar al humano directamente con el consumo de productos de origen animal y otras se identifican como organismos contaminantes de los productos y subproductos pecuarios debido a malas prácticas de elaboración, almacenaje y traslado de alimentos (SSA, 1996; González *et al.*, 2004).

La NOM-121-SSA1-1994 establece que microorganismos como *Listeria monocytogenes*, deben estar ausentes en 25 g de queso; sin embargo, la norma no contempla otros tipos de microorganismos que ya se han reportado y que han sido identificados como patógenos para la población consumidora entre ellos *Brucella* spp. y *Escherichia coli* O157:H7 (Samartino, 2003; Mercado, 2006).

### **1.6.1 Generalidades de *Brucella* spp**

Esta bacteria se encuentra clasificada dentro del Reino Proteobacteria (sección XV de las alfa-proteobacterias), de la clase I *Rhodospirilli*, del orden VI *Rhizobiales* y de la familia IV *Brucellaceae* (Gándara *et al.*, 2001; López, 2006). El género está

compuesto por cepas que infectan hospederos naturales (Candelo, 2004; Castro *et al.*, 2005; Pappas *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2007), *B. abortus* (bovinos), *B. melitensis* (caprinos), *B. ovis* (ovinos), *B. suis* (cerdos), *B. canis* (cánidos) y *B. neotome* (ratas del desierto); además, se han identificado dos nuevas especies, denominadas *B. pinnipediae* y *B. cetaceae* (de focas y cetáceos, respectivamente). Por otra parte, cuatro especies se han identificado como patógenas para el humano *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* (Pappas *et al.*, 2005; Aguirre, 2008).

*Brucella* spp. es una bacteria aerobia intracelular facultativa, Gram negativa, inmóvil, no esporulada, sin cápsula con forma de bacilo corto de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$  de longitud, se presenta de forma aislada o en cadenas cortas, crecen a una temperatura óptima de 37 °C y en un pH de 6.6 a 7.4, para su primo aislamiento las cepas de *B. ovis* y *B. abortus*, necesitan de una atmósfera con una tensión de dióxido de carbono entre 5-10% (Rodríguez *et al.*, 1998; Freer y Castro, 2001). Son catalasa y oxidasa positivas, se tiñen de rojo sobre fondo azul por el método de coloración de Zielh-Neelsen modificado y de color naranja sobre fondo rosado por el método de Koster modificado (Hernández, 2002).

En función del tipo de lipopolisacárido (LPS) presente, existen cepas lisas (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. neotomae*, *B. pinnipediae* y *B. cetaceae*) y rugosas (*B. ovis*, *B. canis*). Las cepas más virulentas son las lisas; sin embargo, durante el cultivo las cepas pueden sufrir mutación y cambiar la expresión de los LPS. En los estudios serológicos, la reacción antígeno anticuerpo está determinada por el LPS-S, pero esta estructura se asemeja a la cadena O de otras bacterias como *Yersinia enterocolitica* O9, *Salmonella iandau*, *Stenotrophomonas maltophilia* y *Escherichia coli* O157:H7, entre otras (Baucheron *et al.*, 2002; Castro *et al.*, 2005; Foster *et al.*, 2007).

### **1.6.1.1 Epidemiología**

La brucelosis es una enfermedad que se conoce desde hace alrededor de 2,000 años en el área del Mediterráneo (Laval, 2006). Marston en 1859, describe su cuadro clínico el cual, Hipócrates ya había detallado hacía más de 2,400 años (Freer y Castro, 2001). Bruce en 1887 aísla la primera especie del género *Brucella* spp. del bazo de un marino en la base de Malta; en México, se reconoce su presencia desde 1905 (Rodríguez *et al.*, 1998).

Esta zoonosis es de distribución mundial con una afectación importante en el Mediterráneo, la península de Arabia, subcontinente Indio, Oeste de Asia, algunas zonas de África, América central y Sudamérica (Memish y Balkhy, 2004). La Organización Mundial de la Salud (OMS) señala que cada año se registran alrededor de medio millón de casos de brucelosis humana en el mundo; en ese sentido, los países de América Latina que registran el mayor número de casos son Argentina, Perú y México. En este último país, las zonas agrícolas centro y norte, son las que presentan mayor prevalencia (Gándara *et al.*, 2001; Rivers *et al.*, 2006).

En México desde los años 80, la brucelosis es considerada una de las zoonosis de mayor importancia debido a las pérdidas económicas que genera en la ganadería; entre 1990 y 2000, se registraron 37,807 casos humanos con un promedio de 3,437 casos/año a pesar de la campaña de vacunación animal que estableció la SAGARPA a nivel nacional (Hernández, 2002; López *et al.*, 1992). En la actualidad la brucelosis está muy distribuida en el país, donde la zona de mayor importancia es la norte seguida de la centro; en el año 2003 el estado de Sinaloa registró 573 casos, por lo que fue la entidad con mayor incidencia para esta enfermedad a nivel nacional (Moreno *et al.*, 2002). El estado de Veracruz reportó una incidencia de 55 casos por año en el periodo entre 1998 y 2004, con una tasa de 0.6 a 1.2 por cada 100 mil habitantes; para 2005, se registraron 71 casos en 100,000 habitantes (SUAVE, 2009). Para 2008 en México se tuvo una incidencia de 1.83 casos por cada 100,000 habitantes, donde el grupo de personas con edades entre los 45 y 49 años seguido

del grupo entre los 50 a 59 y el grupo poblacional que corresponde a menores de 4 años, son los menos afectados (Dirección General de Epidemiología, 2010).

En el hombre, esta zoonosis se relaciona de forma estrecha con la existencia de animales infectados; la infección se adquiere ya sea por contacto directo con éstos o con los productos del aborto, o bien, por consumo de leche no pasteurizada y derivados lácteos provenientes de leche cruda como queso, crema y mantequilla, (SSA, 1995a; López y Contreras, 2006). En 1997 el Instituto Mexicano del Seguro Social, se realizó una investigación que identificó que la causa común de infección por brucelosis se debe al consumo de alimentos no pasteurizados en un 84% de los casos, de los cuales el 40% se relacionó con la ingesta de quesos frescos (Lecuona *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 1998). Por otra parte, los casos de brucelosis que se reportan en los Estados Unidos de Norteamérica, en personas hispanas, se adjudican al consumo de los quesos que se venden de manera ilegal en la franja fronteriza con México (Pappas *et al.*, 2006).

En algunas entidades de España la brucelosis humana es endémica y aún en la actualidad se elaboran y consumen productos lácteos sin pasteurizar, en especial queso, que se ha visto involucrado en brotes de enfermedad en el 41.6% de los casos y en afecciones de pacientes en un 60.12% de un total de 163 casos; también en Perú y Honduras, se han reportado casos asociados al consumo de quesos frescos elaborados a partir de leche sin pasteurizar (Castell *et al.*, 1996; Villamarín-Vázquez *et al.*, 2002).

### **1.6.1.2 Patogenia**

Por su importancia en salud pública y para conocer su mecanismo de infección el género *Brucella* spp. ha sido objeto de diversos estudios tanto "*in vitro*" como "*in vivo*". Su ubicación intracelular le permite estar protegida de los antibióticos y de factores bactericidas del suero como el sistema de complemento y anticuerpos lo

cual, determina la cronicidad de la infección (Díaz *et al.*, 2001; López, 2006); además, su supervivencia también se le atribuye a la inhibición de sistema bactericida haluro-mieloperoxidasa por la liberación de 5'-guanosina y adenina (Tizzard, 2004).

Los factores de virulencia de la bacteria se relacionan con su capacidad de resistir el efecto bactericida de los componentes del suero normal y su capacidad de adhesión, penetración y multiplicación en una gran variedad de células eucariotas (fagocíticas y no fagocíticas) (Rodríguez *et al.*, 1998; Hernández, 2002). La bacteria penetra al organismo por mucosas, en las submucosas, es fagocitada por los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y macrófagos tisulares, en los cuales sobrevive y se multiplica (Pappas *et al.*, 2005).

La bacteria es transportada en los macrófagos por circulación sanguínea, la cual distribuye al microorganismo a los órganos parenquimatosos que constituyen el sistema fagocítico mononuclear ubicado en hígado, bazo, pulmón, riñón, sistema nervioso central y médula ósea (Brooks, 2002; Candelo, 2004).

### **1.6.1.3 Cuadro clínico en el humano**

La brucelosis en humanos es causada en un 90% de los casos por *B. melitensis*; asimismo, se han identificado infecciones por *B. abortus* (Leal-Klevezas *et al.*, 1995).

La presentación de la enfermedad varia de una a dos semanas o hasta meses, esto depende del estado inmunológico de la persona; la infección, puede manifestarse de manera aguda y/o crónica (Rodríguez *et al.*, 1998; Padilla *et al.*, 2003).

En el humano al inicio de la infección, los signos más comunes son dolor abdominal, vómito, fiebre que se eleva por las tardes y desciende por las noches y que se acompaña con diaforesis profusa, cansancio, anorexia, cefaleas y tos; en etapas agudas pueden presentarse adenopatias en el 50% de los casos (Montes, 2004). La presentación de manifestaciones sistémicas, se da mediante afecciones a los sistemas genitourinario, fagocítico mononuclear, neurológico y osteoarticular. Las principales manifestaciones osteoarticulares son la espondilitis, la sacroilitis y la artritis periférica; otras manifestaciones osteoarticulares menos frecuentes incluyen la osteomielitis, tenosinovitis, bursitis y mialgias (Freer y Castro, 2001; Brooks *et al.*, 2002).

La enfermedad se ha clasificado en aguda, sub-aguda con recaídas y crónica; sin embargo, sólo se distinguen dos cuadros el agudo y el crónico. El primero, se presenta como una enfermedad febril de inicio agudo tipo vespertino, con sudoración abundante, algias articulares, musculares o neurológicas, hepatomegalia en un 20 a 50% de los casos y en un 25% de las veces se detecta esplenomegalia. Este tipo de infección también puede desencadenar lesiones cutáneas, erupciones papulonodulares en el tronco y extremidades, de las que puede aislarse el microorganismo; en consecuencia, la sintomatología de esta fase es común a otras patologías por lo que se requiere hacer un diagnóstico diferencial para descartar otras enfermedades como salmonelosis, tifoidea, dengue, paludismo, tuberculosis y leptospirosis, entre otras (Freer y Castro, 2001; Candelo, 2004; Castro *et al.*, 2005).

Por otro lado, si la infección persiste por un periodo de un año, se considera como brucelosis crónica donde la sintomatología se destaca por la presentación de febrículas, astenia, pérdida de peso, ansiedad o depresión; las recaídas o recidivas se presentan en el 15% de los casos, luego de dos a tres meses de terminado el tratamiento (Freer y Castro, 2001; Castro *et al.*, 2005).

## **1.7 Generalidades de *Listeria* spp**

Los primeros datos que se tienen de esta bacteria datan de 1926 cuando Murria observó en conejos de laboratorio un aumento importante de monocitos asociados a su presencia, razón por la cual en un principio se denominó a este microorganismo *Bacterium monocytogenes* (Posfay y Wald, 2004). En 1940 Pirie la denominó *Listeria monocytogenes*, término que permanece hasta la actualidad (Oteo y Alos, 1994).

El género *Listeria* presenta ocho especies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. murria* y *L. denitrificans* (Pascual y Calderón, 2000). A *L. ivanovii* se le asocia en forma ocasional con abortos en animales y la única que se clasifica como patógena para el hombre es *Listeria monocytogenes* por lo que se ha reconocido su importancia en salud pública a nivel mundial (López *et al.*, 2006). Su presencia ha generado brotes y casos aislados de listeriosis asociados al consumo de alimentos que permiten el desarrollo de esta bacteria como son los productos lácteos y en especial el queso fresco elaborado con leche sin pasteurizar (Iñiguez *et al.*, 2002).

### **1.7.1 *Listeria monocytogenes***

Es un microorganismo saprófito, intracelular facultativo, en forma de bacilo corto Gram positivo de 0.4 a 0.5  $\mu\text{m}$  de ancho por 1 a 2  $\mu\text{m}$  de largo, no ramificado, no esporulado, se observa de modo individual o en formación de cadenas cortas (López *et al.*, 2006). Es aerobia facultativa, móvil a 20 °C, pero a mayor temperatura sus flagelos se inactivan, es catalasa positiva y oxidasa negativa; en las pruebas de Voges Proskauer, rojo de metilo y fermentación de la glucosa presenta resultado positivo (De La Fuente, 1993; Oteo y Alós, 1994, Espinoza *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2007; Noriega *et al.*, 2008).

Las colonias de estos microorganismos son pequeñas de 1 a 2 mm, al observarlas con luz transmitida de manera oblicua se aprecian de tonalidad azul-verdoso y producen  $\beta$ -hemólisis en agar sangre, debida a la Listeriolisina O (LLO) que es una citosina sulfidrilo-activada que actúa como estímulo inflamatorio e induce activación celular endotelial, neutrofílica y apoptosis (Stuart, 1998a; Oteo y Alós, 1994; Torres *et al.*, 2005).

Poseen gran capacidad de sobrevivir y multiplicarse en medios no aptos debido a su capacidad de adaptación a concentraciones elevadas de cloruro de sodio (10%) y a límites de pH amplios (4.5-9). Una característica importante es su capacidad de crecimiento a temperaturas que van desde los -4°C hasta los 45°C, lo que les permite ser microorganismos presentes en una gran diversidad de ambientes como el suelo, materia en putrefacción, aguas residuales, ensilado de animales y diversos alimentos crudos o procesados como pollo y pescado frescos y/o congelados, leche no pasteurizada y queso fresco (Baquero *et al.*, 2006; Moreno *et al.*, 2007). Puede sobrevivir a la descongelación y se ha reportado su presencia en el tracto gastrointestinal de animales y humanos (Martínez *et al.*, 2004).

*Listeria monocytogenes* presenta un genoma circular que de 2.944.528 pb ha sido secuenciado en forma reciente, con una relación de G + C de 39%, presenta una cercanía taxonómica en su secuencia RNA ribosomal 16S (RNAr 16S) con la especie *L. innocua*; asimismo, su capacidad cosmopolita se relaciona con los 331 genes que codifican para diferentes proteínas de transporte (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2005).

Mediante técnicas moleculares se han registrado 13 serotipos de *Listeria monocytogenes* con base en sus antígenos flagelares (H) o somáticos (O) los cuales se han organizado en tres grupos; en el primero, se ubican los serotipos 1/2b, 3b, 4b, 4d y 4c; en el segundo los serotipos 1/2a, 1/2c, 3a y 3c, y en el tercero, se encuentran los serotipos menos comunes como el 4a y el 4c (Borucki y Call, 2003; Callejo *et al.*, 2008).



Se han identificado tres serogrupos (1/2a, 1/2b y 4b) responsables en más de un 90% de los casos de la infección en humanos y animales (Torres *et al.*, 2005). De estos el serotipo 1/2a se ha aislado principalmente de alimentos; no obstante el serotipo 4b el principal causante de enfermedad en el hombre (Borucki y Call, 2003).

#### **1.7.1.1 Epidemiología**

El primer reporte de listeriosis en humanos se dió en Dinamarca en 1929; sin embargo, esta enfermedad comenzó a ser de interés hasta la década de 1980, al comenzar a registrarse datos de epidemias y brotes, como ocurrió en Massachussets, California y Francia los cuales estuvieron asociados al consumo de leche no pasteurizada y quesos frescos elaborados con esa leche (Vazquez-Bolan *et al.*, 2001; Espinoza *et al.*, 2004).

A la fecha la listeriosis se ha convertido a nivel mundial en una de las principales enfermedades transmitidas por los alimentos; no obstante que se reportan entre 4 y 8 casos por cada millón de personas, el problema es que la tasa de mortalidad (20 a 30%) es elevada (Torres *et al.*, 2004; Moreno *et al.*, 2007; Poutou *et al.*, 2005).

En Estados Unidos de Norteamérica se notificaron para el 2007 un total de 0.27 casos por cada 100,000 personas (Noriega *et al.*, 2008). En México no se han reportado casos de listeriosis humana; sin embargo, entre el año 2000 y 2001 se identificó para el estado de Sonora un incremento en la incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de 4.0% a 9.9%, con lo cual se aumenta la probabilidad de brotes de listeriosis como problema de salud pública en el país (Moreno *et al.*, 2007).

La listeriosis se puede presentar en cualquier individuo aparentemente sano; sin embargo, existen grupos de personas que son más susceptibles, como las mujeres

embarazadas, neonatos, infantes, personas de la tercera edad y pacientes con enfermedades crónicas o con SIDA (Espinoza, 2004; Gallegos *et al.*, 2007). Un factor predisponente para la presentación de la infección en este grupo de personas, es la disminución de inmunidad celular (Poutou *et al.*, 2005).

Se considera que entre 10<sup>2</sup> y 10<sup>4</sup> bacterias de *Listeria* spp. / g de alimento, son necesarias para producir la infección en las personas (Schöbitz *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2007). En la década de los 80 del siglo XX, se presentaron los primeros brotes de infección por el consumo de leche o sus derivados. En 1981, se reportó por vez primera la presencia de listeriosis en Nueva Escocia, Canadá con 41 infectados, de los cuales el 2.8% correspondieron a adultos y el 14% a recién nacidos; en 1983 en Massachussets, EUA se tuvo el segundo reporte, donde se identificó a 49 personas afectadas (Albarracín *et al.*, 2006; D'amico *et al.*, 2008).

En diferentes partes del mundo se han realizado estudios para la identificación de este microorganismo en leche; en este sentido, en los países de primer mundo, las proporciones en su identificación han sido bajas, 4.4% y 4.6% en Holanda y Francia, respectivamente, pero difiere con lo encontrado en los países en vías de desarrollo como Colombia, donde se ha determinado su presencia hasta en un 34% en las leches sin pasteurizar, un 2% en pasteurizadas y un 33.1% en quesos blandos (Poutou *et al.*, 2005). En un estudio realizado en Pamplona en 185 muestras de quesos procedentes de tiendas, plazas de mercado y supermercado se identificó en un 35.5% y en un 64.5% la presencia de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp., respectivamente (Albarracín *et al.*, 2006).

### **1.7.1.2 Patogenia**

*Listeria monocytogenes* es una bacteria saprofita intracelular facultativa que debe su patogenicidad a su capacidad de adherirse, invadir y multiplicarse dentro de células no fagocíticas (Torres *et al.*, 2005). Debido a su parasitismo intracelular, se le ha

empleado para el estudio del mecanismo molecular de la patogénesis intracelular bacteriana, ya que es capaz de provocar su propia fagocitosis en células fagocíticas y no fagocíticas del hospedador, lo que permite su diseminación sin ser atacada por los anticuerpos y por el sistema de complemento (Vázquez-Bolan *et al.*, 2001; Melgarejo *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2005).

El proceso de entrada e invasión está determinado por una serie de eventos patogénicos (Callejo *et al.*, 2008):

1) La infección se inicia con el ingreso del alimento contaminado que es captado por enterocitos al cruce de la barrera intestinal; una vez fagocitadas por las células bactericidas son transportadas a los macrófagos del hígado (el cual acumula más del 90% de las bacterias) y al bazo; el proceso de internalización celular se media por las Internalinas (InI) A y B.

2) El escape de la vacuola fagocítica está mediada por la acción de la listeriolisina O (LLO) y la fosfolipasa C fosfatidil inositol específica, que se encargan de lisar el fagosoma. La LLO presenta similitud en función y antigenicidad con la estreptolisina O (SLO) presente en *Streptococcus pyogenes*, que son toxinas dependientes del colesterol con función de formación de poros. La característica principal de esta toxina, es su capacidad de activarse a pH bajo entre 4.5 y 6.5.

3) El desarrollo bacteriano en el citosol está mediado por un transportador Hpt (fosfato hexosa bacteriano) y una proteasa protein lipolato (LpLA1), que le permite captar fuentes de carbono de las células; la multiplicación se lleva a cabo casi siempre en el citosol de los hepatocitos.

4) La bacteria se mueve hacia la membrana celular de la célula hospedera y genera estructuras semejantes a pseudópodos, que se extienden en células vecinas al propiciar su infección mediante la formación de una vacuola de doble membrana que contiene a la bacteria; el proceso de liberación bacteriana es igual al del proceso de liberación de las vacuolas fagocíticas.

La capacidad de infección de *L. monocytogenes* está determinada por los genes de virulencia que presenta los cuales, se encuentran ubicados en las islas de patogenicidad (PAIs), adquiridas por las bacterias, mediante transferencia genética horizontal (Callejo *et al.*, 2008). Son seis los genes reconocidos como responsables

del parasitismo del microorganismo, PrfA, PlcA, hly, mpl, actA, actB y plcB, genes que se encuentran ubicados en la isla 1 de patogenicidad de *Listeria* (grupo de genes de virulencia PrfA dependiente), isla cromosomal de 9kb (Oteo y Alos, 1994).

El primer gen virulento identificado fue el gen hly, debido a que los investigadores se centraron en la actividad hemolítica que producía el microorganismo. Su función se basa en evitar la destrucción de la bacteria dentro del fagosoma; asimismo, desempeña otras funciones de interacción con el hospedero (Vázquez-Boland *et al.*, 2001).

### **1.7.1.3 Patología en el humano**

La listeriosis afecta a un determinado grupo de personas susceptibles; sin embargo, ha sido aislada a partir de pacientes sanos (Torres *et al.*, 2004; López *et al.*, 2006).

La infección puede presentarse de forma diseminada o localizada en el Sistema nervioso central (SNC); a su vez, se observan lesiones en piel y globo ocular; en las mujeres embarazadas se puede presentar aborto espontáneo o la transmisión de la enfermedad al feto, también se puede dar el nacimiento de productos con problemas neurológicos (Callejo *et al.*, 2008). Se han descrito manifestaciones granulomatosas y microabcesos en diversos órganos incluido el SNC, riñón, pulmón y placenta (Schöbitz *et al.*, 2001).

En las mujeres embarazadas la infección puede cursar asintomática o con manifestaciones de fiebre, molestia general, mialgias, lumbalgia, dolor abdominal, vómito, diarrea ocasional, al término de la gestación no se requiere tratamiento para la infección, en algunos casos se presenta fiebre postparto e infección en loquios (Schuchat *et al.*, 1991; Noriega *et al.*, 2008).

Durante el embarazo se puede presentar bacteriemia que alcanza a diseminar la infección vía transplacentaria y da lugar a la infección congénita, a partir del quinto mes de gestación, o partos prematuros, en los que se registra una mortalidad neonatal del 50-90% (Callejo *et al.*, 2008). Las formas clínicas de la listeriosis neonatal son la de inicio precoz, donde se observa bajo peso al nacer, bronconeumonía septicémica o muerte por diseminados en particular en hígado, bazo y vellosidades coriónicas; otra presentación es la de inicio tardío que se presenta de una a ocho semanas después del nacimiento y cursa con un síndrome febril causado por meningitis o debido a gastroenteritis y neumonía, la causa de esta infección es por aspiración de exudados maternos o infección intrahospitalaria caracterizada por meningitis purulentas, la cual si es bien tratada, presenta una mortalidad menor al 20% (Farber *et al.*, 1991)

La infección en adultos se caracteriza por síntomas gastrointestinales como náuseas y vómitos y se produce infección al SNC en el 55% - 70% de los casos que conlleva a meningoencefalitis con cambios severos de conciencia y trastornos y, en algunos casos, se presenta parálisis de nervios craneales. En los pacientes con cáncer, se puede presentar con frecuencia una meningitis bacteriana; no obstante, existen otras formas atípicas de la listeriosis como la endocarditis, miocarditis, arteritis, neumonía, pleuritis, hepatitis, colecistitis, peritonitis, abscesos localizados y artritis (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2004).

### **1.8 Generalidades de *Escherichia coli*.**

Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y fue aislada por primera vez por Theodor von Escherich, pionero en la medicina pediátrica quien la denominó *Bacillus commune*; después, se le designó como *Escherichia coli* (Oquendo, 2006). Es uno de los grupos de bacterias que colonizan el intestino del humano en pocas horas después de su nacimiento y en adultos representa el 0.1% de la flora normal bacteriana, indispensable para el desarrollo normal y la salud de las personas; asimismo, ésta junto con otras bacterias entéricas son necesarias para la síntesis de

la vitamina K y del complejo de la vitamina B (Pascual y Calderón, 2000). Habita también en el intestino de animales, donde su función es el mantenimiento del equilibrio de la flora normal (Romero, 1999; Rodríguez, 2002).

*Escherichia coli* es de forma bacilar o cocobacilar, Gram-negativa, anaerobia, móvil porque presenta flagelos peritricos, catalasa positiva, oxidasa negativa, anaerobia facultativa, algunas cepas que son fermentadoras de lactosa, dan resultado negativo en la prueba de Voges-Proskauer. Las cepas se clasifican por serología con base en los antígenos que presenta ya sean somáticos (O), flagelares (H) o capsulares (K). (Stuart, 1998b).

Este microorganismo es destruido en el ambiente externo por almacenarlo en frío y a temperatura de pasteurización; para determinar el grupo patógeno al que pertenecen, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación, el cual varía de manera continua. En la actualidad se cuenta con un registro de 176 antígenos O, 112 H y 60 K; la serotipificación de la especie necesita del empleo de un gran número de serotipos (Rodríguez, 2002).

En lo general, esta bacteria se relaciona con problemas gastroentéricos por el consumo de agua o alimentos contaminados que causan casi siempre problemas diarreicos, los cuales permiten que sean clasificados en cuatro síndromes diferentes en dependencia del serotipo de la cepa involucrada; así, existen cepas asociadas con el síndrome entero patógeno denominadas EPEC, otras con el entero toxigénico o ETEC, entero invasivo o EIEC y entero hemorrágico o EHEC como *E. coli* O157:H7 que pertenece a este último y que es considerada de las más patógenas (Leotta *et al.*, 2005).

Las cepas de *Escherichia coli* asociadas al síndrome EHEC producen la toxina shiga, la cual causa graves problemas gastroentéricos, que pueden llegar a comprometer la vida del paciente; dentro de este grupo de cepas toxigénicas, existe un amplio rango

de serotipos de los cuales el O157:H7 se ha asociado con problemas epidémicos (Roldan *et al.*, 2007).

### **1.8.1 *Escherichia coli* O157:H7**

Esta es una de las cepas relacionadas con el síndrome entero hemorrágico o EHEC (de sus siglas en inglés "entero haemorrhagic *Escherichia coli*") que se caracteriza por producir fiebre y diarreas acuosas con sangre y cuya manifestación clínica se denomina colitis hemorrágica (CH), que se asocia con la ingesta de carne cruda o mal cocida (Roldán *et al.*, 2007; Martínez y Villalobos, 2004).

La importancia de este serotipo surge en la década de los 80, al relacionarse con la aparición de una serie de brotes epidémicos reportados en Oregón y Michigan en EUA debidos al consumo de alimentos contaminados; por ello, es que se le reconoce como causal de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (Leotta *et al.*, 2005). Desde entonces, los casos por ETA por este agente se han reportado en Canadá, Japón, Reino Unido y Argentina, donde el último tiene la mayor incidencia a nivel mundial (Romero, 1999; Marzocca *et al.*, 2006; Vernozy-Rozand *et al.*, 2005)

La infección por este serotipo puede ocasionar cuadros diarreicos que progresan a colitis hemorrágica de presentación severa; esta signología se presenta en un 5 a 10% de las personas afectadas, las personas senectas y los niños menores de 5 años, son más susceptibles en desarrollar el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Rivero *et al.*, 2004; Narváez *et al.*, 2007). Gasser en 1955 describe y define este síndrome como la aparición brusca en una persona que en apariencia se encuentra sana a la presentación de una anemia hemolítica microangiopática, asociada a trombocitopenia e Insuficiencia Renal Aguda (IRA); en 1958 se especificó su patogenia y para 1964 en Argentina, se dió a conocer el aspecto clínico, la evolución y el tratamiento del síndrome en fase aguda (Roldan *et al.*, 2007).

Por lo anterior, la Organización Mundial de Sanidad Animal (originalmente oficina internacional de epizootias OIE) la considera como una zoonosis bacteriana de origen alimentario, de gran importancia en la salud pública; por lo que la Organización Mundial de la Salud la clasificó dentro de las principales ETA (Gómez *et al.*, 2002; Narváez *et al.*, 2007).

El serotipo presenta variaciones en su actividad metabólica con respecto al género, ya que es fermentador de sorbitol y lactosa; asimismo, es resistente a ambientes ácidos que pueden ser letales para otros microorganismos y puede sobrevivir a temperatura de refrigeración de entre 3 y 7 °C (Sánchez, 1997; Romero, 1999).

Por otro lado, tiene capacidad para resistir la temperatura de congelación y pH extremo (4.4-9.0), permitiéndole ser un contaminante del agua (lagos, albercas, piletas, etc.) y alimentos como la carne, verduras, jugo de frutas, la leche y sus derivados sin pasteurizar, como el queso y el yogurt (Franco *et al.*, 2001; Roldan *et al.*, 2007; Michanie, 2003). La presencia de esta bacteria en los alimentos se relaciona con contaminación fecal, ya sea durante su preparación o desde el momento de la ordeña en el caso de la leche (Rodríguez *et al.*, 2002).

Esta bacteria se ha aislado de animales domésticos como bovinos, porcinos, caprinos y ovinos, que son considerados como reservorios; por otra parte, ya se ha demostrado su presencia en fauna silvestre (rumiantes salvajes y roedores) (Rivero *et al.*, 2004; Rivas *et al.*, 2006; Gallegos *et al.*, 2009). De éstos, los bovinos son los principales reservorios y puede causar en becerros cuadros de diarrea hemorrágica, deshidratación, debilidad y retardo en el crecimiento. Esta signología no se da en los animales adultos, por lo que éstos solo se comportan como portadores asintomáticos (Narváez *et al.*, 2007; Gallegos *et al.*, 2009).



### **1.8.1.1 Epidemiología**

El serotipo O157:H7 de *E. coli* tiene distribución mundial, puede sobrevivir por varios días expuesto al medio ambiente y varios meses en agua. Así, la región Este del Pacífico de EUA se ve afectada por este serotipo y se registran en todo el país entre 10,000 y 20,000 casos por año y 250 fallecimientos; también en Europa y América del Sur, las personas son afectadas (300/año) de manera importante por este microorganismo (Sánchez, 1997; Huguet *et al.*, 2002). Por otra parte, en México no se tiene un registro de datos respecto a infecciones producidas por este serotipo o su presencia como contaminante de alimentos, por lo que se mantiene bajo el criterio de "sin evidencia" (Rivero *et al.*, 2004).

En Argentina el cuadro grave provocado por este microorganismo es endémico y las Unidades Hospitalarias de Nefrología, reportaron una incidencia de 400 casos anuales entre diciembre de 1989 y enero de 1990; además, en el primer caso de infección transmitida por agua de la red pública, se vieron afectadas 243 personas de las cuales fallecieron el 1.6% de los infectados (INIFAP 2004; Roldán, 2007). De la misma manera, el primer reporte de infección por consumo de sidra de manzana se reportó en Canadá en 1991 (Stuart, 1998).

La presentación de la infección en humanos parece tener relación con la época del año; así, en Estados Unidos se ha determinado que existe un mayor número de casos durante el verano, aunque no se ha identificado la razón de este hecho, aunque también se ha reportado que en esta misma época los animales presentan una mayor prevalencia (LeJeune *et al.*, 2004).

### 1.8.1.2 Patogenia

*E. coli* O157:H7 produce una toxina similar a la shiga (neurotoxina producida por *Shigella dysenteriae*) denominada Verotoxina, debido a su capacidad de causar efecto citopático en cultivos de las células Vero; esta toxina está codificada por bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano (Sánchez, 1997; Rodríguez, 2002). Las shigotoxinas (Stxs), se clasifican en Verotoxina 1 (VT1) y Verotoxina 2 (VT2), ambas son lábiles al calor y tienen la capacidad de inhibir la síntesis de proteínas en células eucariotas. Las Verotoxinas están formadas por dos polipéptidos, un pentámero de adhesión formado por cinco unidades B y una subunidad A (Rivero *et al.*, 2004; Leotta, 2005).

La VT1 es idéntica a la toxina shiga, su función es la inhibición de la síntesis proteica y la muerte celular; para provocar esto, sus subunidades B se enlazan con la globotriaosilceramida (Gb3), lo que facilita la entrada de las unidades A en la célula blanco para romper el enlace *N*-glucosídico, así se produce la liberación de adenosina y da como resultado que el factor de elongación 1 (EF-1) no facilite el enlace del tRNA aminoacílico con el ribosoma. Por su parte, la VT2 tiene una acción parecida, la diferencia que presenta es que los anticuerpos dirigidos contra la toxina shiga no la neutralizan en comparación con la VT1 (Stuart, 1998; Marzocca *et al.*, 2006).

*E. coli* O157:H7 cuenta con otros factores de virulencia como los de adherencia intestinal como el gen *eae*, que codifica la proteína intimina responsable de la unión de la bacteria con el enterocito y de la desorganización de las vellosidades que producen la lesión AE (del inglés attaching and effacing); otro factor, es la enterohemolisina pO157 que está codificada por un plásmido de 60 megadaltones (Mda); de esta forma el conjunto de estos factores de virulencia, son los que confieren la categoría de enterohemorrágica a la bacteria (Rodríguez, 2002; Michanie, 2003; Rivas *et al.*, 2007)

### **1.8.1.3 Sintomatología en el humano**

*E. coli* O157:H7 produce diarrea acuosa sanguinolenta con dolor abdominal intensos calambres, presencia o ausencia de vómito y fiebre, los pacientes que cursan con SUH, presentan anemia hemolítica microangiopática, púrpura trombocitopenica trombotica y falla renal aguda. En la actualidad se reconocen otras lesiones isquémicas en el sistema nervioso central y órganos como páncreas, pulmones, retina, intestino y corazón (Rivero *et al.*, 2004; Roldán *et al.*, 2007).

Los síntomas se presentan entre tres y nueve días posteriores a la ingesta del alimento contaminado, con un curso clínico de dos a nueve días de duración (Ramírez *et al.*, 1999).

Posterior a este periodo, la diarrea sanguinolenta se intensifica; tras este período, el paciente puede presentar mejoría o desarrollar el SUH (Lagos *et al.*, 2002). El desarrollo de este síndrome se relaciona directamente con la infancia y la senectud, con leucocitosis, el uso de fármacos antimotilidad y con tratamientos antimicrobianos previos (Rivero *et al.*, 2004).

El SUH se puede identificar mediante exámenes de laboratorio y que corresponde al inicio agudo de anemia, con una hemoglobina de 10mg/dl o hematocrito menor a 30%; daño renal reflejado por hematuria, proteinuria, uremia mayor de 50 mg/dl en ausencia de deshidratación o creatinina elevada y recuento plaquetario menor a 150,000/mm<sup>3</sup> (Rivas *et al.*, 2007).

## **1.9 Métodos Diagnósticos**

### **1.9.1 Aislamiento bacteriológico**

#### **1.9.1.1 *Brucella* spp**

El diagnóstico definitivo de la enfermedad se establece por aislamiento bacteriológico, que se encuentra especificado en la Norma Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995: "Campaña nacional contra la brucelosis en los animales" y su identificación por medio de lisis por bacteriófagos específicos y pruebas bioquímicas de rutina; como es un microorganismo de crecimiento lento, su identificación se obtiene en un periodo de 10 a 15 días (Lara, 2006).

Las muestras para el aislamiento, se pueden obtener a partir de animales vivos, las muestras de predilección son las secreciones vaginales tras el aborto o parto, así como leche y semen; en el caso de la leche, el mejor momento para recolectar la muestra es al momento del aborto o poco tiempo después del mismo debido a que es el periodo en que las bacterias se encuentran en mayor cantidad (Díaz *et al.*, 2001; Hernández *et al.*, 2002).

Los medios de elección para el aislamiento son los selectivos, debido a que se inhibe el crecimiento de flora contaminante; el medio selectivo de Farrell, es el recomendado por la OMS ya que permite la selección y crecimiento de *Brucella* (Díaz *et al.*, 2001; Lara, 2006).

El cultivo se realiza por duplicado, una parte se incuba en ambiente de aerobiosis, y la otra mitad se incuba con adición de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) entre 5 y 10%, lo cual nos permite distinguir entre *B. abortus* y *B. ovis* del resto de las *Brucellas* por que crecen bajo estas condiciones (OIE, 2000; González *et al.*, 2007).

### **1.9.1.2 *Listeria* spp.**

El aislamiento bacteriológico es la prueba de oro para el diagnóstico; en el caso de *Listeria monocytogenes* a partir de alimentos, se va a requerir el empleo de medios selectivos y un procedimiento de enriquecimiento para las muestras (OIE, 2008)

Se han descrito diferentes metodologías para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* a partir de alimentos, los cuales se consideran como reglamentos internacionales, tal es el caso de los métodos propuestos por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), el método de la Asociación Oficial de Químicos Analistas (AOAC), los estándares de la ISO11290, el procedimiento del Servicio de Inspección y Seguridad Alimentaria (FSIS), el departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA); en este sentido en México se cuenta con la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSAI-1995. Bienes y servicios. "Método de prueba microbiológico para alimentos: Determinación de *Listeria monocytogenes*" en la cual se especifican los lineamientos a seguir para la identificación del microorganismo (OIE, 2008; Moreno *et al.*, 2007).

Para el estudio de *Listeria monocytogenes* a partir de alimentos y tejidos, se requiere de un pre-enriquecimiento de las muestras para inhibir patógenos contaminantes e incrementar el número de bacterias presentes; para el análisis de alimentos, sólo se necesitan 25 g obtenidos a partir de diferentes sitios de la muestra fresca o congelada para que ésta sea representativa. Es importante señalar que el procedimiento se debe realizar a temperatura de refrigeración (4°C) (Gallegos *et al.*, 2007).

El aislamiento a partir de leche y derivados lácteos se realiza con la metodología descrita en el Bacteriological Analytical Manual por Hitchins (1998), la cual coincide con lo señalado en la Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSA1; en cuanto al empleo de un pre-enriquecimiento de las muestras y el uso de medios selectivos como el Oxfor o PALCAM y la identificación por fermentación de carbohidratos y la actividad hemolítica (Baquero *et al.*, 2006; Callejo *et al.*, 2008).

### **1.9.1.3 *Escherichia coli* O157:H7**

Para el estudio de *Escherichia coli* O157:H7 se han desarrollado diferentes medios selectivos como Agar MacConkey sorbitol (SMAC), seguido del CT-SMAC (cefixima-telurito de potasio), el Agar cefixima-ramnosa (CR-SMAC), medios que contiene MUG (4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucurónido) y los que contienen BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -Dglucurónido) (Vidal *et al.*, 2002; Conedera *et al.*, 2004).

Las colonias de *Escheria coli* O157:H7 procedentes de alimentos crecen mejor en agar MacConkey-Sorbitol (SMAC) con telurito de potasio y cefixima, ya que permite un mejor inhibición de otros microorganismos presentes en los alimentos que llegan a impedir el crecimiento de la bacteria; en el medio SMAC se identifican colonias sorbitol negativas, la siembra se realiza también después de un pre-enriquecimiento, el cultivo se lleva a cabo a 37°C en un tiempo de 18-24 hrs (Feng y Weagant, 2002; LeJeune *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2007).

Las colonias sospechosas son sometidas a pruebas de identificación bacteriológicas de rutina dentro de las que se encuentran la coloración de Gram,  $\beta$ -glucoronidasa, la producción de gas, la fermentación de azúcares, la citocromo oxidasa, el malonato, la ureasa, el citrato, el Voges-Proskauer, el indol, la prueba de ortonitrofenil  $\beta$ -galactopiranosido (ONPG), la lisina y ornitina descarboxilasa, el rojo de metilo y la de motilidad (Marzocca *et al.*, 2006; Narváez *et al.*, 2007).

## **1.10 Pruebas moleculares**

### **1.10.1 *Brucella* spp**

Para el aislamiento de *Brucella* spp se requieren de 1000 Unidades Formadoras de Colonias (UFC), concentración que no está disponible en todas las muestras, por lo que este procedimiento es limitado; esta situación ha propiciado el empleo de técnicas moleculares como la Prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), ya que permite poner de manifiesto la presencia del DNA genómico bacteriano (Moreno *et al.*, 2002; Aguirre *et al.*, 2008).

El empleo de la técnica de PCR para la identificación de *Brucella* spp. se estableció hace poco más de una década, ya que además de favorecer la identificación de la bacteria, permite la identificación de especies; esta técnica se denominó AMOS por las iniciales de las especies que distingue (*B. abortus*, *B. melitensis*, *B. ovis* y *B. suis*), a su vez entre las cepas vacunales y de campo (Castro *et al.*, 2005; Imaoka *et al.*, 2007).

En los inicios del PCR, se empleó un iniciador derivado de una secuencia de 16rRNA, la cual indicó especificidad de género, por lo que la secuencia se probó en leche de animales positivos, en la cual se obtuvo una sensibilidad del 87.5%; por lo que su aplicación sirvió para confirmar aislados de cepas de campo y cepas de referencia (Romero *et al.*, 1995; Aguirre, 2008). Para comprobar la especificidad de la prueba, se han realizado estudios a partir de muestras inoculadas, de campo y de animales sanos, en los que no se observaron los amplificadores de los fragmentos esperados (Leal-Klevezas *et al.*, 1995).

Para la obtención del DNA genómico, se han implementado diversos métodos, los cuales han sido probados con resultados óptimos; la importancia de realizar una buena técnica de obtención del DNA se debe a que algunas muestras que se emplean

para el estudio por su naturaleza, contiene material que interfiere con el procedimiento de la técnica, como el contenido de proteínas. Ante esto, diversos autores han propuesto metodologías para la extracción que se emplean en la actualidad con modificaciones; asimismo, se han propuesto diferentes técnicas como la PCR multiplex, para la identificación de diversos genes de la bacteria que permiten definir la especie de *Brucella*, o la técnica de PCR convencional para la identificación de género (Leal-Klevezas *et al.*, 1995; Romero *et al.*, 1995; Ewalt y Bricker, 2000)

### **1.10.2 *Listeria monocytogenes***

La identificación de *Listeria* spp. por bacteriología convencional requiere un periodo de más de 15 días, lo cual no es favorable para llegar a una identificación oportuna dentro de la industria alimenticia, donde un resultado en corto tiempo permitiría establecer medidas higiénicas. Ante esta desventaja, se requiere del empleo de técnicas sensibles, específicas y rápidas que permitan identificar patógenos en periodos de tiempo cortos como la técnica de PCR, la cual permite detectar al género *Listeria* en materiales crudos y productos procesados (Manzano *et al.*, 1997; Torres *et al.*, 2004).

La PCR se emplea así mismo a partir de cultivos puros de la bacteria, en algunas investigaciones, se ha empleado el marcador del gen *iap*; sin embargo, no en todos los estudios ha dado resultados favorables, ya que ha marcado para otros géneros bacterianos como *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. En este sentido, se ha identificado una secuencia genómica que ha demostrado que el gen *lmo2234*, es un marcador específico para *Listeria monocytogenes* (Doumith *et al.*, 2004).

*Listeria monocytogenes* cuenta con trece serovares, de los cuales solo el 1/2a, 1/2b y 4b son los importantes, debido a que han sido aislados de diversos brotes (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Para identificar los diferentes serotipos y factores de virulencia, el uso de la PCR multiplex resulta útil ya que permite el estudio de ambos en solo un



proceso; debido a la importancia de esta bacteria, la Organización Mundial de la Salud desarrolló un manual que contiene un listado de iniciadores para identificar género, especie y serotipos (Poutou *et al.*, 2005).

### **1.10.3 *Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* O15:H7 puede causar infección con un bajo número de células, lo que disminuye la posibilidad de aislamiento y puede generar resultados falsos positivos (Leotta *et al.*, 2005; Gallegos *et al.*, 2009). La técnica de PCR permite la identificación de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de muestras con baja concentración bacteriana; en México, se emplea esta técnica en la clínica para la identificación de especies patógenas del género, con resultados rápidos y confiables dada su alta especificidad y sensibilidad (Rivero *et al.*, 2004).

En la actualidad diversos autores concuerdan que el uso de PCR mediante los genes *rfbE* y *fliC* que codifican para el lipopolisacárido O157 y flagelina respectivamente, permiten identificar los antígenos O y H; para determinar género, especie y factores de virulencia (toxinas Shiga), se emplea la PCR multiplex (Lin *et al.*, 1993; Vidal *et al.*, 2002).

## **1.12 HIPÓTESIS**

Los quesos frescos que se expenden en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río, están contaminados con *Brucella* spp, *Listeria monocytogenes* y / o *Escherichia coli* O157:H7.

## **1.13 OBJETIVOS**

### **1.13.1 General**

Determinar la presencia de *Brucella* spp, *Listeria monocytogenes* y /o *Escherichia coli* O157:H7 a partir de quesos elaborados con leche sin pasteurizar expedidos en los mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río.

### **1.13.2 Específicos**

- a) Estimar la frecuencia de *Brucella* spp, *L.monocytogenes* y *E. coli* O157:H7 en quesos frescos sin pasteurizar
- b) Identificar mediante el empleo de técnicas moleculares como PCR a *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7.

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Localización**

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Diagnóstico ubicada en la Posta Zootécnica Torreón del Molino de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Veracruzana en la Ciudad de Veracruz, en el Laboratorio de Microbiología General de la Escuela Nacional de Ciencia Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en la Ciudad de México y en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria (CENID) Microbiología del INIFAP.

Los quesos empleados se colectaron de queserías ubicadas en los mercados con registro y que corresponden al Malibrán, Zaragoza, Hidalgo, Unidad Veracruzana en el municipio de Veracruz y Abastos Boticaria en el de Boca del Río.

Las muestras se obtuvieron en dos ocasiones y que pertenecieron a las temporadas de estiaje y lluvias del año 2009, entre las 8:00 AM y 12:00 PM por considerar que a mayor tiempo de exposición, podría incrementarse la flora contaminante.

### **2.2 Diseño experimental y tamaño de muestra**

El tipo de estudio fue epidemiológico transversal y, para determinar el tamaño de muestra, se empleó el programa Win Episcopy Ver. 2.0 bajo la modalidad detectar enfermedad, para una prevalencia de 6% y nivel de confianza de 95% (Thrusfield *et*

al., 2001). Así el tamaño de muestra correspondió a 25 quesos; sin embargo, al contar en la conurbación con 30 queserías, se decidió coleccionar muestras de todas ellas. El número total de quesos analizados fue de 60, ya que se trabajaron 30 muestras de la temporada de estiaje y otras 30 en la de lluvias. La fórmula que emplea el programa de referencia para calcular el tamaño de muestra es el señalado por Thrusfield (2005).

---

Donde:

SD es el valor de la desviación standar

t es el valor de la t de Student

L es el error absoluto aceptado

### **2.3 Cepas de Referencia**

Par el desarrollo de las pruebas diagnósticas de bacteriología y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se emplearon cepas de referencia, *Brucella abortus* 544, *Listeria monocytogenes* 19114 y *Escherichia coli* O157:H7

### **2.4 Recolección de Muestras**

Se coleccionaron 100 g por muestra para después dividirla en cuatro porciones de 25 g por microorganismo (una porción más se reservó en congelación para colección). Las muestras se colocaron en doble bolsa Ziplok® y se etiquetaron con el nombre del

local, mercado y la hora en que se obtuvieron (SSA, 1995b); para su conservación, se emplearon bolsas de refrigerantes comerciales y se trasladaron al laboratorio de microbiología donde se mantuvieron a temperatura de refrigeración de 4 °C hasta su procesamiento.

## **2.5 Procesamiento de las Muestras**

### **2.5.1 Métodos bacteriológicos**

Para el aislamiento de los microorganismos, las muestras se enriquecieron con suplementos específicos para cada agente etiológico con la finalidad de eliminar la flora contaminante; y después, se sembraron en medios selectivos para cada bacteria y se identificaron con el empleo de pruebas bioquímicas convencionales y especiales para cada microorganismo.

El enriquecimiento se realizó de cada porción de 25 g de queso, para lo cual se tomaron secciones de la superficie, los costados e interior, con el fin de obtener una muestra homogénea. Transcurrido el tiempo de enriquecimiento, las muestras fueron maceradas en morteros y colocadas en matraces Erlen Meyer de 500 ml, que contenían 225 ml de caldo de enriquecimiento o EB (de sus siglas en inglés enrichment broth) dentro de una campana de flujo laminar, para evitar la contaminación ambiental (Renaldi *et al.*, 2008; Roldan *et al.*, 2007).

### **2.5.1.2. *Brucella* spp**

De las muestras pre-enriquecidas en caldo de soya tripticaseína adicionado con suplemento Farrell, se tomaron 100 µl para realizar las siembras en el medio selectivo de Farrell por duplicado. Así, una mitad de los medios se incubó en atmósfera de aerobiosis y la otra en microaerobiosis bajo presión de 5 a 10% de bióxido de carbono (velobiosis) en estufa de cultivo. Las placas se revisaron a intervalos de 48 horas, para buscar crecimiento de colonias con características morfológicas descritas para estos microorganismos (Alton *et al.*, 1988); una vez que se obtuvieron las colonias sugestivas, se realizó su resiembra en agar de soya tripticaseína y a partir de estos crecimientos, se realizaron las pruebas de identificación por tinción de Gram y Ziehl – Neelsen modificado para *Brucella* spp., pruebas de catalasa, oxidasa, Citrato de Simmons, Triple azúcar hierro, Medio Urea, SIM y producción de ácido sulfhídrico o H<sub>2</sub>S (Martínez *et al.*, 2009).

### **2.5.1.3 *Listeria monocytogenes***

EL aislamiento de este microorganismo se llevó a cabo bajo las especificaciones de la NOM-143-SSAI-1995 que indica un pre-enriquecimiento el cual, se modificó ya que no se empleó extracto de levadura. El medio se incubó a 30 °C por 24 h; posteriormente, se tomaron 100 µl de la superficie del enriquecimiento que se sembraron en medio Oxford para *Listeria* spp. a una temperatura entre 35 y 37 °C durante 18 a 48 horas. Las colonias grisáceas rodeadas de un halo negro de centro deprimido y reflejos verdosos, se consideraron sugestivas y se resembraron en placas de medio selectivo bajo las mismas condiciones (Moreno *et al.*, 2007).

A partir de cultivos puros de no más de 24 horas, se procedió a la identificación de la bacteria por la observación de las colonias mediante iluminación de Henry, movilidad en fresco, reacción a la tinción de Gram, prueba de catalasa, motilidad en agar (incubado entre cuatro y cinco 5 días a 37°C); asimismo, se identificaron por el

fenotipo con las pruebas bioquímicas convencionales como hemólisis (por picadura), reducción de nitratos, uso de carbohidratos y la de Cristie-Atkins-Munch-Peterson (CAMP) con *Staphylococcus aureus* que se incubaron a 37 °C por 48 horas (SSA, 1998).

#### **2.5.1.4 *Escherichia coli* O157:H7**

Para obtener mayores posibilidades en el aislamiento de esta bacteria se realizó a cada 25 g de muestra un pre-enriquecimiento en 225 ml de EB que se incubaron a 37 °C por 24 h (Narváez-Bravo *et al.*, 2007). Posterior a ello, se llevó a cabo la siembra en medios SMAC con 100 µl de sobrenadante del cultivo y se incubaron entre 35 y 37 °C por 18 a 24 h. Una vez identificadas las colonias sugestivas, se procedió a realizar la siembra de éstas en cajas de cultivo con agar de soya tripticaseína con extracto de levadura (TSAYE) y se incubaron por 18 a 24 Hrs. a 35 °C. Las colonias que presentaron morfología característica se aislaron para cultivo puro.

A partir de aislados frescos se identificó al microorganismo por su reacción a la tinción de Gram, motilidad en agar, prueba de catalasa, oxidasa, fermentación de lactosa, producción de indol, rojo de metilo y Voges-Proskauer (Feng y Weagant, 2002).

### **2.5.2 Métodos moleculares**

#### **2.5.2.1 Extracción de DNA**

La identificación de *Brucella* spp. se realizó de macerados de las muestras de quesos, las cuales se centrifugaron a 4°C para la obtención de la crema; en el caso de *Listeria*



*monocytogenes* y *Escherichia coli* O157:H7, el DNA se obtuvo a partir de cultivos puros de no más de 24 horas.

#### **2.5.2.2 Método a partir de muestras**

Para la identificación de *Brucella* spp se maceraron 25 g de cada muestra de queso colectada para obtener la grasa mediante centrifugación. Después se recuperaron 400 µl del sobrenadante en tubos eppendorf a los que se le añadió 200µl de Tris EDTA (TE) 1X y 30 µl de duodecil sulfonato de sodio al 10% o SDS (por sus siglas en inglés de Sodium Dodecyl Sulfate) que se mezclaron en un vortex y posterior a ello, se les agregó proteinasa K, para incubarse por 10 minutos a 65 °C. A esta suspensión se le añadieron 50 µl de NaCl 5M y 50 µl de bromuro de cetil-trimetil-amonio al 10% (P/V) disuelto en NaCl 0.7 M o CTAB (por sus siglas Cetyltrimethylamonium bromide). La nueva mezcla se agitó con un vortex de nueva cuenta y se incubó por 10 minutos a 65°C. Luego, se adicionaron 500 µl de cloroformo isoamilico (24:1), se mezcló en el vortex hasta observar que la suspensión se tornara blanca y se centrifugó a 18,000 x g por seis minutos y la fase acuosa se colocó en 500 µl de fenol-cloroformo-isoamilico (25:24:1). Se mezcló por inversión y se dejó reposar toda la noche a -20°C. De nuevo, la mezcla se centrifugó a 18,000 x g por seis minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet de DNA se lavó con etanol al 70%. El DNA se secó a temperatura ambiente y se re suspendió en 50 µl de agua grado molecular (Ausbel et al., 1995).

#### **2.5.2.3 Método a partir de cultivo**

De un aislamiento puro se tomó una asada que se colocó en un tubo tipo Eppendorf que contenía 200 µl de TE 1X y 30 µl de SDS, se agitó con un vortex y se le agregaron 6 µl de Proteinasa K. La mezcla se incubó a 37 °C por 90 minutos. Para eliminar péptidos y lípidos residuales, se adicionaron 50 µl de NaCl 5M y CTAB al 10% (p/v) disuelto en NaCl 0.7M en la misma proporción, se mezclaron con el vortex y se

introdujo en baño María a 65°C por 10 minutos. La suspensión resultante, se trató con 500 µl de cloroformo-isoamilico (24:1) que también se agitó con el vortex hasta observar la mezcla de color blanco; después, se centrifugó a 18,000 x *g* por seis minutos, se tomo la fase acuosa y se añadieron 500 µl de isopropanol, para dejar precipitar toda la noche a -20°C. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 18,000 x *g* por seis minutos se desechó el sobrenadante y el DNA precipitado se lavó con etanol al 70%, se secó a 45° por cinco minutos y se re-suspendió en 50 µl de agua grado molecular (Romero y López-Goñi, 1999).

### **2.5.3 Procedimiento de pcr**

#### **2.5.3 1 *Brucella* spp**

Los iniciadores que se emplearon correspondieron a un fragmento de 233 pb del gen que codifica para la proteína antigénica de 31 kDa, BCSP31, B4 (5'-TGGCTCGGTTGCAATATCAA-3') y B5 (5'-CGCGCTTGCCCTTCAGGTCT G-3') de invitrogen. El volumen total por reacción fue de 24 µl compuesto por 2 µl de buffer, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dNTP's, 2 µl de iniciador, 0.2 µl de enzima Taq y 11.3 µl de agua grado molecular. La PCR se realizó en un termociclador Bioec XP cycler, con un programa que comprendió una desnaturalización inicial a 94 °C por cinco minutos, seguido de 35 ciclos que inician con una desnaturalización a 94°C por un minuto, alineamiento a 64°C por un minuto y una extensión de 72°C por un minuto. Se terminó con una extensión final de 72 °C (Baily *et al.*, 1992).

### **2.5.3.2 *Listeria monocytogenes***

Se identificó una secuencia de 173 pb que corresponde a la identificación de género y especie por las secuencias genéticas LL7/1F (TTGCCAGGAATGACTAATCAAGA) Y LL8/1R (GATTCAGTGTAAAGCCATTTTCGTC) de invitrogen. La mezcla para PCR fue de 24 µl, integrada por 2 µl de buffer, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de dNTP's, 2 µl de iniciador, 0.2 µl de enzima Taq y 11.3 µl de agua grado molecular. El protocolo de PCR comprendió 15 minutos de desnaturalización y 35 ciclos que incluyó un minuto a 94 °C de desnaturalización, un minuto a 64 °C de alineamiento y un minuto a 72 °C para su extensión. Se terminó con una temperatura final de extensión de 72 °C por tres minutos (Omiccioli *et al.*, 2009).

### **2.5.3.3 *Escherichia coli* O157:H7**

Para esta bacteria se identificó el gen de virulencia Stx2 (Forward: 5'-CTTCGGTATCCTATTCC-3' Reverse: 5'-CTGCTGTGACAGTGACAAAACG-3') de invitrogen. que codifica para la Verotoxina 2 que amplifica 518 pb. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 25 µl integrados por 2 µl de buffer, 1.5 µl de MgCl<sub>2</sub>, 3 µl de dNTP's, 2 µl de iniciador, 0.2 µl de enzima Taq y 11.3 µl de agua grado molecular. La amplificación se realizó bajo las siguientes condiciones de corrida: un ciclo de desnaturalización a 95 °C por cuatro minutos, seguido de 35 ciclos de tres pasos, desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 59.5 °C por 30 segundos y una extensión por cinco minutos a 72 °C, con una extensión final a 72 °C por cinco minutos (Gallegos *et al.*, 2009).

#### **2.5.4 Gel de agarosa**

Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, teñido con bromuro de etidio ( $0.5 \mu\text{l mL}^{-1}$ ) en una mezcla de  $4 \mu\text{l}$  del producto amplificado por  $1 \mu\text{l}$  de bromuro, se uso un Marcador 1kb plus de invitrogen y visualizado en un documentador de geles con luz ultravioleta (Rentería *et al.*, 2005).

#### **2.6 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos, se almacenaron en una hoja de cálculo Excel, los resultados se analizaron para significancia de datos categóricos de chi-cuadrada ( $\chi^2$ ), con la finalidad de determinar si la presencia de los microorganismos patógenos presentes en los quesos que se expenden en los mercados de la zona conurbada Veracruz-Boca del Río, se asocia con el sitio de venta (mercado), la procedencia del producto y/o la época del año (Thrusfield, 2005).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Localización del área de estudio

En el área de estudio se tienen registrados siete mercados; sin embargo, para este trabajo sólo se consideraron cinco y que correspondieron a Abastos Boticaria, Malibrán, Hidalgo, Unidad Veracruzana y Zaragoza, debido a que los restantes carecen de queserías. De los existentes, Malibrán es el más grande y el que cuenta con el mayor número de queserías, por lo que es del que se obtuvieron el mayor número de muestras, como se aprecia en la figura 1.

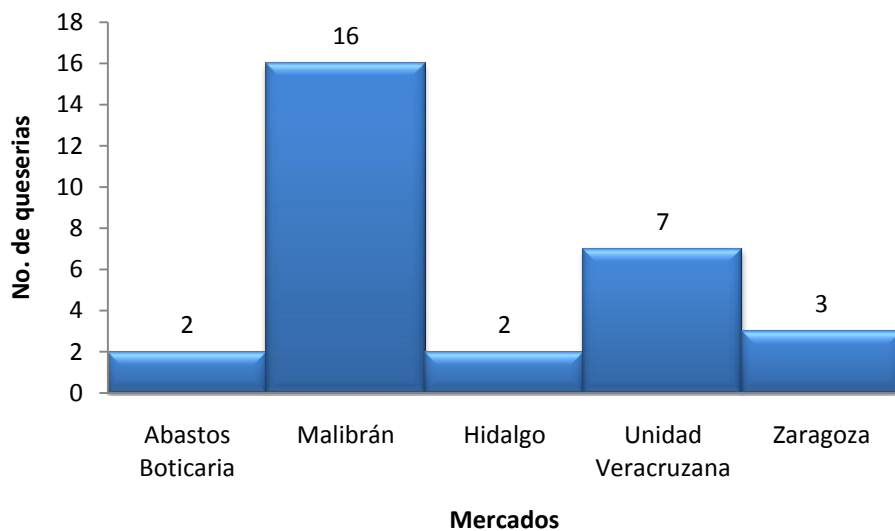


Figura 1. Gráfico de los mercados utilizados en el estudio.

Los estudios enfocados a la identificación de bacterias patógenas en alimentos, en su mayoría, se realizan en mercados y con vendedores ambulantes, lo anterior se debe a que los datos obtenidos permiten conocer la situación real de la calidad sanitaria de los alimentos y el riesgo que el consumo de éstos implica para la salud pública (Barroso *et al.*, 2007; González *et al.*, 2007).

Estudios como los realizados por Schöbitz *et al.* (2001), Franco *et al.* (2001) y Baquero *et al.* (2006), a partir de muestras obtenidas en los puntos de venta, resaltan las malas condiciones higiénicas durante su comercialización y que corresponde con el mal manejo que se observó en esta investigación al momento de adquirir los quesos, como la presentación del producto para su venta, almacenamiento y, en algunos casos, la ausencia de refrigeración lo que genera un mayor factor de riesgo para los consumidores.

Los quesos que se expendían en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río proceden de diversas localidades como se observa en la figura 2, pues durante la adquisición de los quesos que se usarían como muestras, se preguntó a cada distribuidor sobre la procedencia de éstos, lo que permitió identificar 17 zonas diferentes de procedencia de los quesos que se distribuyen en la conurbación.

Así fue posible observar que del municipio de Ignacio de la Llave también conocido como región de la Mixtequilla, es de donde procedieron 18/60 (30%; IC<sub>95%</sub> 19.2-43.37) de los quesos colectados; sin embargo, como también se expresa en la figura 2, 8/60 (13.33%; IC<sub>95%</sub> 6.33-25.14) de queserías que desconocen la procedencia de los quesos que venden, lo que limita la posibilidad para definir la totalidad de los municipios de donde proceden los productos que podrían estar contaminados con microorganismos patógenos y establecer en forma adecuada zonas de riesgo para la salud pública por consumo de estos productos. La brucelosis es una patología que tiene como principal vía de infección la ingesta de alimentos contaminados, por lo que es necesario conocer las zonas donde se presenta la enfermedad y de dónde proceden los alimentos que allí se consumen, ya que esto permite el análisis de la

dinámica de la población vinculada con la transmisión y diseminación de la enfermedad (Leynaud y Reati 2009).

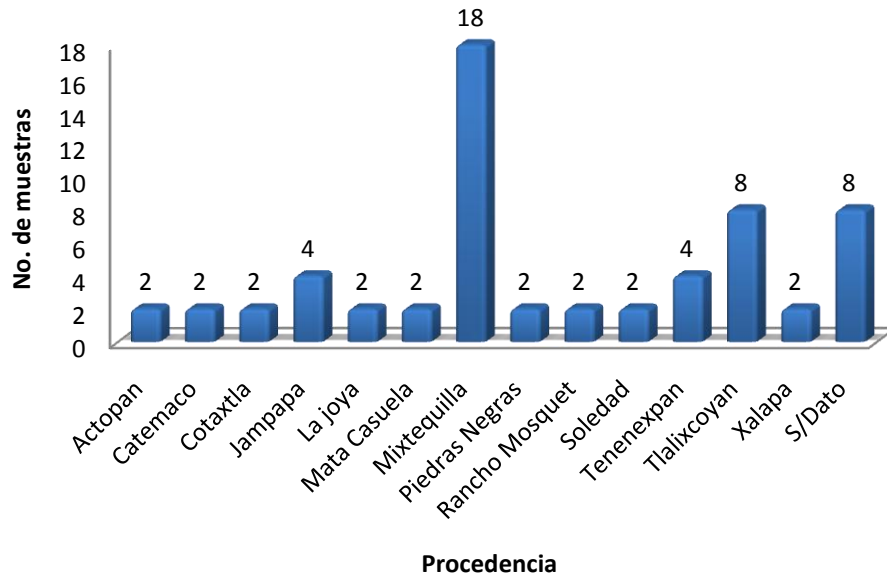


Figura 2. Municipios de procedencia de los quesos que se expende en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río.

### 3.2 Aislamiento e identificación microbiológica

#### 3.2.1 *Brucella* spp

En la presente investigación no se logró el aislamiento de ninguna de las especies del género *Brucella* en ambas épocas del año de las muestras colectadas en las queserías de los mercados seleccionados; resultado que debe ser interpretado con cautela, debido a la aparente ausencia de la bacteria en los quesos estudiados, pues para

lograr un aislamiento de *Brucella* spp. es necesaria una carga mínima de 1,000 UFC por ml o g de muestra (Yeager *et al.*, 1967), concentración bacteriana total que pudo no estar presente al momento de realizar el estudio.

Además dada la naturaleza de los quesos, su manipulación y exhibición en las queserías e inclusive durante el proceso de elaboración, los productos tienden a contaminarse con múltiples bacterias, por lo que las muestras procesadas presentaron crecimiento de flora contaminante como *Pseudomonas* spp., microorganismos antagónicos hacia el género *Brucella* porque provocan reducción en la cantidad de UFC viables, debido a la producción de bacteriocinas y otros metabolitos que son detrimentales en la supervivencia del microorganismo y que, por tanto, disminuyen las posibilidades de aislamiento, como ya se había demostrado en un estudio realizado por González *et al.* (2007), en el que se realizó la búsqueda de *Brucella* spp. en lácteos y quesos y, tampoco tuvieron éxito en el aislamiento de la bacteria, pero sí de *Pseudomonas* spp.

Martínez *et al.* (2008) han identificado *Brucella* spp. al emplear pruebas bacteriológicas convencionales con la crema de la leche procedente de animales infectados. El uso de este tipo de muestras incrementa la posibilidad de aislamiento, ya que se trabaja con muestras directas, no así a partir de alimentos procesados, debido a que éstos ya no presentan las condiciones naturales, ya que durante la elaboración de los quesos, se lleva a cabo un proceso de fermentación que provoca una disminución drástica del pH, lo que elimina una proporción de las bacterias presentes, incluida *Brucella* spp. a pesar de su poca sensibilidad al pH ácido (González *et al.*, 2007); por otro lado, si en una unidad de producción sólo algunos animales secretan la bacteria, al realizar el acopio de la leche y mezclarla, favorece una dilución bacteriana y también limita el aislamiento de la bacteria.

La presencia de *Brucella* spp. se ha reportado en leche y productos lácteos con anterioridad (Acha y Szyfres, 2003). Así en México, el 40% de los casos de brucelosis se relacionan con el consumo de quesos frescos (Lecuona, 1997), situación que se repite en Estados Unidos de Norteamérica, donde los casos que se reportan están



relacionados con el consumo de quesos estilo mexicano (frescos) elaborados e introducidos al país de manera ilegal, pues carecen de permiso sanitario para su internación a los EUA; además, la mayoría de las personas afectadas y que se encuentran ligadas a su consumo, corresponde a migrantes latinos cuya idiosincrasia fomenta el consumo de ese tipo de productos (Pappas *et al.*, 2006).

La brucelosis ocasionada por consumir lácteos contaminados afecta también a España, donde Barroso *et al.* (2007) han determinado que la infección interpoblacional se asoció al consumo de productos contaminados y vendidos de forma clandestina; sin embargo, por la aparición clínica lenta, no fue posible obtener los quesos para su análisis microbiológico. Por su parte, en México existen zonas endémicas de brucelosis como Guanajuato, donde en 2009 se presentaron 47 casos por consumo de quesos contaminados (Ochoa, 2009), lo cual confirma que los quesos son una de las principales causas de infección en la población mexicana.

### **3.2.3 *Listeria monocytogenes***

En la presente investigación se aislaron cepas de *Listeria* spp. de 15/60 (25%; IC<sub>95%</sub>: 15.11-38.12) muestras de queso, como se puede apreciar en la figura 3, mismas que se sometieron a pruebas de identificación para conocer las que pertenecían a la especie *L. monocytogenes*, por lo que se les aplicaron las pruebas bioquímicas correspondientes como motilidad en fresco y en medio sólido, reacción a la tinción de Gram, hidrólisis de la esculina,  $\beta$ -hemólisis y CAMP.

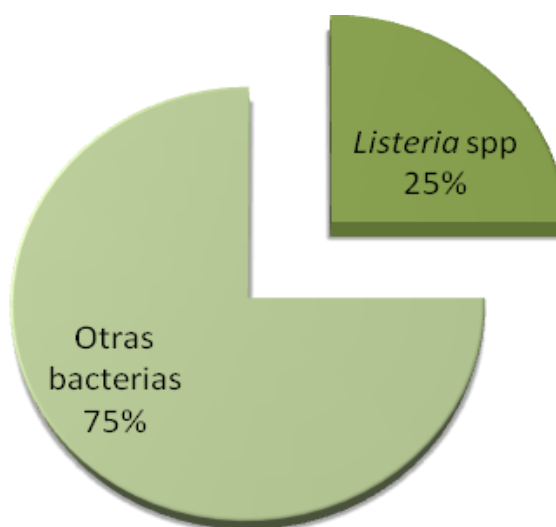


Figura. 3. Aislamiento de *Listeria* spp. del total de quesos analizados

En las zonas del trópico se incrementa la concentración de sal en los quesos con la finalidad de alargar el tiempo de vida en anaquel del producto; estas condiciones de pH bajo, concentración de sal alta, junto con el empleo de leche no pasteurizada y la manufactura artesanal, procedimiento común en México, permiten a *Listeria* spp. sobrevivir en el queso (Sim *et al.*, 2002; Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Al aislar *Listeria* spp. se coincide con los anteriores, en el sentido de la importancia que representa el desarrollo de las bacterias del género y se resalta que, los quesos frescos que se venden en la conurbación Veracruz-Boca del Río, carecen de inocuidad para los consumidores.

De las 15 cepas de *Listeria* spp. aisladas, una (6.6%) fue identificada como *Listeria monocytogenes* según se aprecia en la figura 4, lo que permitió observar que 1/60 (1.6%; IC<sub>95%</sub>: 0.09 – 10.14) de los quesos que se expenden en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río, contienen a esta bacteria en particular.

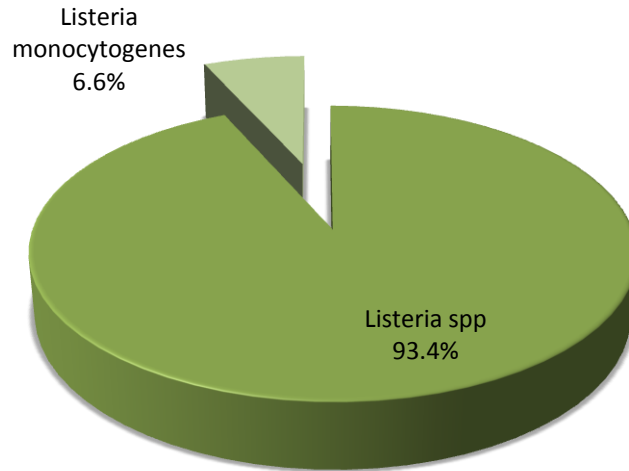


Figura. 4. Identificación de *L. monocytogenes* a partir de los aislados de *Listeria* spp.

La presencia de *Listeria monocytogenes* es considerada de importancia para la salud pública desde los años 80 y por ello, su identificación se ha convertido en una práctica común en la industria alimentaria (Sánchez *et al.*, 2006; Gallegos *et al.*, 2007); sin embargo, se carece de control en los pequeños establecimientos o con fabricantes particulares que en ocasiones adolecen de registro ante las autoridades sanitarias para la elaboración y venta de sus productos. No obstante que la normativa mexicana (SSA, 1998) señala que *L. monocytogenes* debe estar ausente en quesos, Saltijeral *et al.* (1999) demostraron su presencia en un 3.4% de los quesos que estaban listos para la venta, proporción en apariencia elevada al ser comparada con la obtenida en esta investigación, donde el 1.6% de los quesos se encuentran contaminados; sin embargo, si se considera el IC<sub>95%</sub> (0.09 – 10.14%) de la proporción, resulta que los resultados son similares y que deja en claro que no se cumple con la normatividad existente.

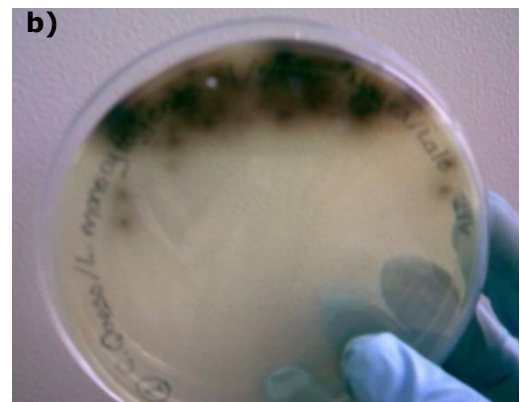
A nivel mundial existe gran interés por conocer la calidad de los alimentos, por ello se han realizado diversos estudios en quesos para identificar *Listeria monocytogenes*; así Villanueva (2002), encuentra en quesos peruanos 38.8%, Baquero *et al.* (2006), determinan que el 0.4% de los quesos en una región de Colombia se encuentran contaminados y en España, Vitas *et al.* (2004) reportan 11.4% de quesos

contaminados, por lo que la presencia de *L. monocytogenes* varía entre los estudios; sin embargo, sí se puede establecer que los quesos en menor o mayor proporción presentan contaminación.

La identificación de *Listeria monocytogenes* se realizó conforme a las pruebas establecidas en la NOM 143-SSA1-1995; de este modo sólo una de las 15 cepas aisladas (6.6%; IC<sub>95%</sub>: 0.35 – 33.97) correspondió con la reacción tintorial, motilidad, β-hemólisis y CAMP como se observa en la figura 5 (a). Para el aislamiento, de *Listeria* spp. se empleó el medio selectivo Oxford, que favorece el desarrollo de las bacterias del género según se aprecia en la figura 5 (b)



Figura 5. a). Sinergismo de cepas de *Listeria monocytogenes* en CAMP



(b). Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en medio Oxford

*Listeria monocytogenes* tiene la capacidad de hidrolizar la esculina, glucósido que en el medio de Oxford se observa por la formación de un fondo negro como producto del desarrollo de las colonias grisáceas que se aprecian en la figura 5 (b). Por otra parte, una de las pruebas para distinguir a la especie del resto de las del género *Listeria* es la prueba de CAMP, en la que se observa el sinergismo entre las hemolisinas de *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* mediante una zona hemolítica intensa en forma de "punta de flecha" como se puede observar en la figura 5 (SSA-

1998; Callejo *et al.*, 2008), eventos que coincidieron con la única cepa aislada e identificada como *L. monocytogenes* en este estudio.

Para la identificación de *Listeria monocytogenes* con el uso de técnicas bacteriológicas convencionales, es necesario un periodo de tiempo de al menos 15 días (Baquero *et al.*, 2006), situación que limita su uso y, por tanto, en la actualidad, se emplean procedimientos rápidos como el sistema API *Listeria* que permite identificar género y especie en 24 horas; Villalobos y Martínez (2007) identificaron *Listeria monocytogenes* en 20% de quesos frescos procedentes de establecimientos públicos en Venezuela. Por otra parte, debido a la incapacidad para contar con ese tipo de sistemas en los laboratorios de las instituciones donde se realizó el diagnóstico bacteriológico y porque se emplearon sólo los métodos establecidos en la normatividad vigente en la presente investigación, no se hizo uso de este tipo de procedimientos, pero el resultado obtenido fue satisfactorio al lograr identificar la bacteria mediante el uso de las metodologías convencionales oficiales.

Con la finalidad de contar mayores posibilidades para el aislamiento de la bacteria, se muestreó a todas las queserías de los mercados seleccionados en las temporadas de estiaje y lluvias. Así se identificó una cepa de *Listeria monocytogenes* de ocho aisladas (12.5%; IC<sub>95%</sub>: 0.66 – 53.32) y que en apariencia se pudo recuperar en la temporada de estiaje como se aprecia en la figura 7, pero con los datos obtenidos no fue posible establecer diferencias ( $P > 0.05$ ) entre temporadas.

*Listeria monocytogenes* es un microorganismo que posee la capacidad de adaptarse a bajas temperaturas, hecho que confirmaron Berrang *et al.* (2002), al señalar que la presencia de la bacteria se ve favorecida en temporada fría y que en apariencia podría ser semejante a este trabajo; sin embargo, como la identificación de la especie se dio en una sola muestra, no fue posible demostrar diferencias ( $P > 0.05$ ) para la época de estudio; además, en la conurbación las temperaturas entre las temporadas no son tan distintas, lo que permite coincidir con lo realizado por Moreno *et al.* (2007) en un estudio con quesos que se venden en los mercados del estado de Sonora, México, donde identificaron que la bacteria se encuentra presente durante todas las

épocas del año, pero que en el invierno que corresponde a la época de estiaje, se aislaron una mayor cantidad de cepas de *L. monocytogenes*.

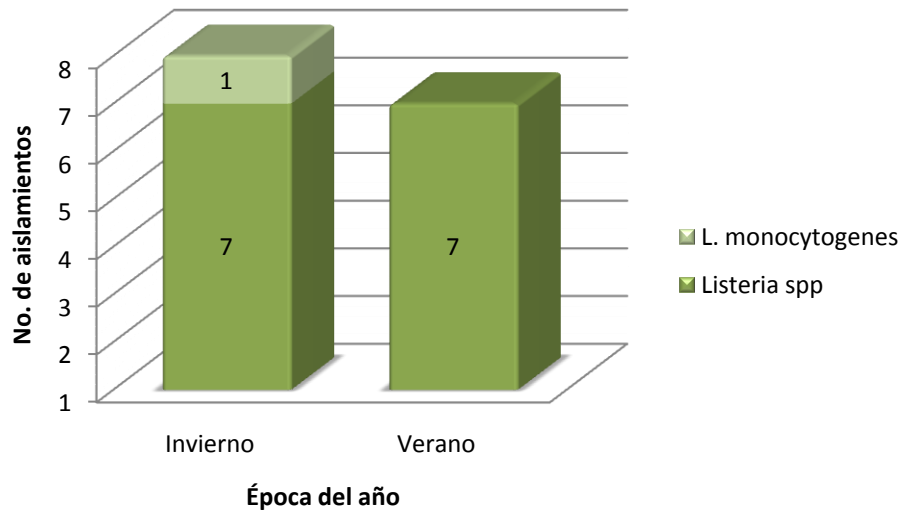


Figura. 6 Aislamiento de *Listeria monocytogenes*, por época del año

Por otra parte, la cepa aislada en esta investigación se obtuvo del Mercado Malibrán y su origen fue Tenenexpan, municipio de Manlio Fabio Altamirano (25%; IC<sub>95%</sub>: 1.32-78.06) lugar de donde procedieron la mayoría de las muestras y, por tanto, mayor probabilidad de aislamiento e identificación del agente. En independencia del punto de venta de donde se obtuvo la muestra, lo relevante del caso, es confirmar la presencia de *Listeria monocytogenes* en los quesos que se venden en la zona conurbada Veracruz-Boca del Río y que genera un riesgo para la salud pública de los consumidores.

### 3.2.4 *Escherichia coli* O157:H7

*Escherichia coli* se identificó en las 60 muestras de quesos procesadas en esta investigación; sin embargo, al realizar la serotipificación para identificar el serotipo O157 en las cepas aisladas, solo 9/60 (15%; IC<sub>95%</sub>: 7.5 – 27.08) muestras resultaron positivas como se expresa en la figura 7.

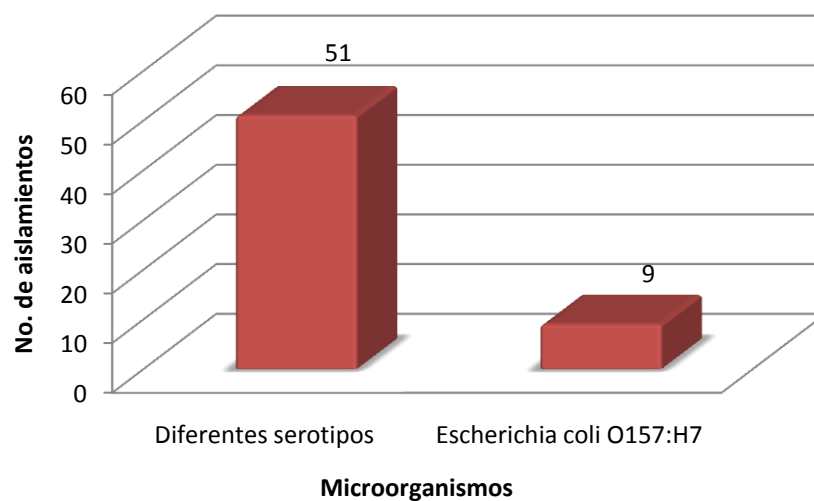


Figura 7. Identificación de cepas de *E. coli* con antígeno somático.

México carece de estudios sistemáticos de búsqueda, así como de reportes de este microorganismo, lo que difiere con EUA donde se reportan 20,000 enfermos y una mortalidad de 250 personas por año (Roldan *et al.*, 2007).

Para el proceso de recuperación de *Escherichia coli* O157:H7, se empleó la metodología indicada por la FDA, pero se modificó al no emplear novobiocina en el pre-enriquecimiento, lo que favoreció el crecimiento de otras bacterias que no se identificaron por no ser el propósito de la investigación; sin embargo, fue posible visualizar colonias bacterianas con morfología colonial propias del género *Salmonella* spp., que también pueden ser contaminantes directos de la leche o de algún punto de

la cadena de producción. En este contexto, Cristóbal y Maurtua (2003) identificaron bacterias aerobias mesófilas elevadas en el producto terminado y que son consecuencia de la contaminación en algún punto de la cadena; de este modo, algunas de las bacterias presentes resultaron ser patógenas, lo que compromete la salud del consumidor y determina la mala calidad del producto, que también se traduce en una reducción del tiempo de vida de anaquel, pues la descomposición se acelera.

La presencia de *Escherichia coli* O157:H7 en la leche y productos lácteos se relaciona de manera directa con infección en bovinos, evento que en apariencia fue confirmado por Narváez-Bravo *et al.* (2007) al aislar a la bacteria de muestras de heces de bovinos sin signos de enfermedad; sin embargo, Cicutta *et al.* (2006), refiere que la contaminación puede ser cruzada durante la elaboración de los quesos, por contacto directo del humano con animales o interpersonal, por la ruta fecal – oral, por lo que sólo se puede especular que la contaminación de los quesos analizados en esa investigación, pudo provenir de leche contaminada con heces, por malas prácticas higiénicas.

La leche contiene sustancias naturales con capacidad antimicrobiana como el sistema lactoperoxidasa, que podría inhibir e inactivar *Escherichia coli* O157:H7 (Heusvelink *et al.*, 1999). Esta condición y el efecto de dilución por el acopio del producto, disminuyen la posibilidad de aislar la bacteria. Autores como Conedera *et al.* (2004) y Vernozy-Rozand *et al.* (2005), no identificaron *E. coli* O157:H7 a partir de leche o derivados; sin embargo, Addul-Raouf *et al.* (1996) describieron la contaminación de lácteos en un 6%, cifra afín a la obtenida por Franco *et al.* (2001) que obtuvo 5% obtenido en quesos tipo campesino, mientras que en el presente trabajo se identificó el 15% (IC<sub>95%</sub>: 7.5 – 27.08) de contaminación por *Escherichia coli* O157:H7, que es una proporción que puede estar asociada a lo antes señalado.

En ambas temporadas del estudio, se logró el aislamiento de cepas sorbitol negativo, sin mostrar un diferencia significativa entre ellas, ya que para la temporada de estiaje



se recuperaron 5/30 aislamientos 16.67% (IC 95% 6.31-35.45) y 4/30 (13.33%; IC<sub>95%</sub>: 4.36-31.64) en la de lluvias como se observa en la figura 10.

Por otra parte, los nueve aislamientos de *Escherichia coli* O157:H7 se obtuvieron de tres de los mercados seleccionados, de manera que del Malibrán se logró de 4/16 queserías (25%; IC<sub>95%</sub>: 8.33-52.59), en el Unidad Veracruzana de 4/7 (57.14%; IC<sub>95%</sub>: 20.24-88.19) y del Hidalgo de 1/2 (50%; IC<sub>95%</sub>: 2.67-97.33); asimismo por lugar de procedencia, se aisló de 3/8 quesos de Tlaxicoyan (37.5%; IC<sub>95%</sub>: 10.24-74.11), 1/18 de Ignacio de la Llave o región de la Mixtequilla (5.56%; IC<sub>95%</sub>: 0.29-29.38) y de 5/8 se desconoció el lugar de procedencia (62.5%; IC<sub>95%</sub>: 25.89-89.76). Esto coincide con Franco *et al.* (2001), en el sentido de que reportaron el aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en un 5% a partir de muestras de quesos procedentes de puntos de ventas de cuatro municipios de Bogotá, al igual que Bravo y Villalobos (2002) que reportan un 3.15% de aislamientos a partir de carne molida y chorizo procedentes de un mercado en Venezuela. La alta proporción de aislamientos obtenida en este estudio, permite suponer que a pesar de que los mercados seleccionados están registrados y deben cumplir con reglas sanitarias, las autoridades no realizan las observaciones pertinentes para ver que la normatividad se cumpla.

La cantidad de aislamientos fue similar para las dos temporadas estudiadas, por lo que no se observaron diferencias significativas ( $P > 0.05$ ) entre ellas; así como tampoco, para mercado de procedencia ( $P > 0.05$ ), pues los aislamientos fueron similares (Cuadro 1).

Existen géneros bacterianos que presentan estacionalidad, es decir, que la posibilidad de aislamiento se concentra por temporadas; sin embargo, en la presente investigación no fue el caso, ya que la recuperación de *E. coli* O157:H7 fue similar en lluvias como en estiaje, lo cual se puede relacionar con el nicho ecológico del agente (intestino grueso de algunos animales, en particular el del bovino) que favorece la presencia de la bacteria en cualquier momento y la posibilidad de que se transmita a otros animales o al humano; a este respecto, algunos autores (Noriega *et al.*, 2008; Rossi *et al.*, 2008) concluyen que la contaminación de los alimentos puede darse

durante su elaboración o por el empleo de materias primas que contengan la bacteria (Romero, 1999).

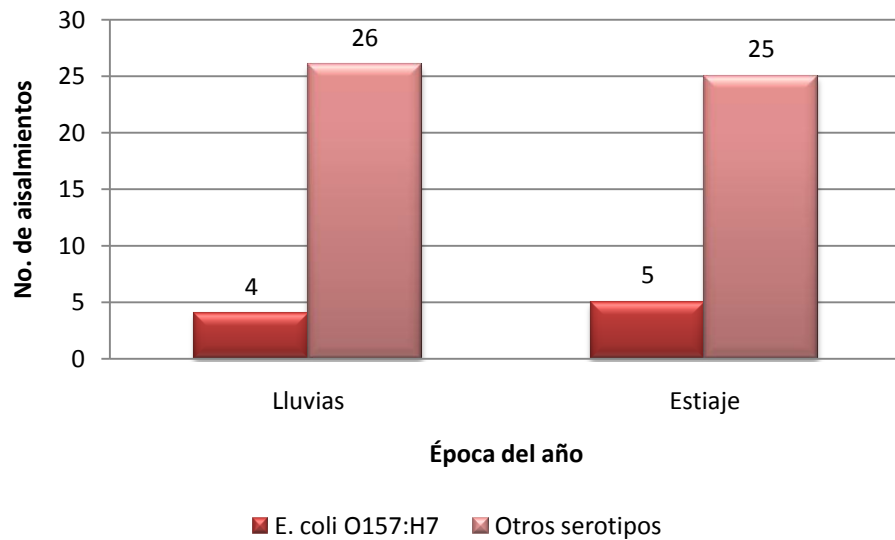


Figura 8. Aislamiento de *E. coli* O157:H7 por época del año estudiada.

*Escherichia coli* O157:H7 tiene la capacidad de sobrevivir en ambientes ácidos (pH 3.4) por días a temperatura de refrigeración (Rodríguez, 2002); aunque en este trabajo los quesos analizados no sobrepasaron los siete días post elaboración debido a que durante el proceso de recolección de las muestras de queso se pudo constatar que la vida en anaquel no era mayor a los tres días, por lo que se cumplieron las condiciones necesarias para su aislamiento.

En el cuadro 1 se muestra que la recuperación de la bacteria no presentó variación respecto al mercado de procedencia para las temporadas de estiaje y lluvias estudiadas.

CUADRO 1. Aislamiento de *E. coli* O157:H7 en muestras de queso por mercado y época del año.

Mercados	Época del año	
	Estiaje	Lluvias
Abastos Boticaria	0	0
Malibrán	2	2
Hidalgo	1	1
Unidad Veracruzana	2	1
Zaragoza	0	0

La recuperación del agente se logró en 3/5 (60%; IC<sub>95%</sub>: 17.04 – 92.74) de los mercados en estudio, dentro de los cuales se encuentran el de mayor número de queserías y que corresponde al Malibrán y uno de los que tiene el menor número de establecimientos que es el Hidalgo. Lo anterior es de la mayor importancia, porque los aislamientos no son de puestos ambulantes dentro de los mercados seleccionados, sino de sitios de venta establecidos y con registro ante las autoridades municipales por lo que destaca la nula o baja verificación sanitaria, que al realizarse podría evitar que se expendieran alimentos que mermaran la salud de los consumidores (OPS, 1994; Narváez-Bravo *et al.*, 2007).

### 3.3 Identificación del microorganismo por PCR

#### 3.3.1 *Brucella* spp.

Se identificaron cuatro (6.67%; IC<sub>95%</sub>: 2.16 – 17.01) amplificados de las 60 muestras procesadas que correspondieron a 223 pb (Fig. 9) que identifican parte del gen BSCP31, que se empleó para determinar la presencia de DNA de *Brucella* spp. obtenido en forma directa de los quesos en estudio.

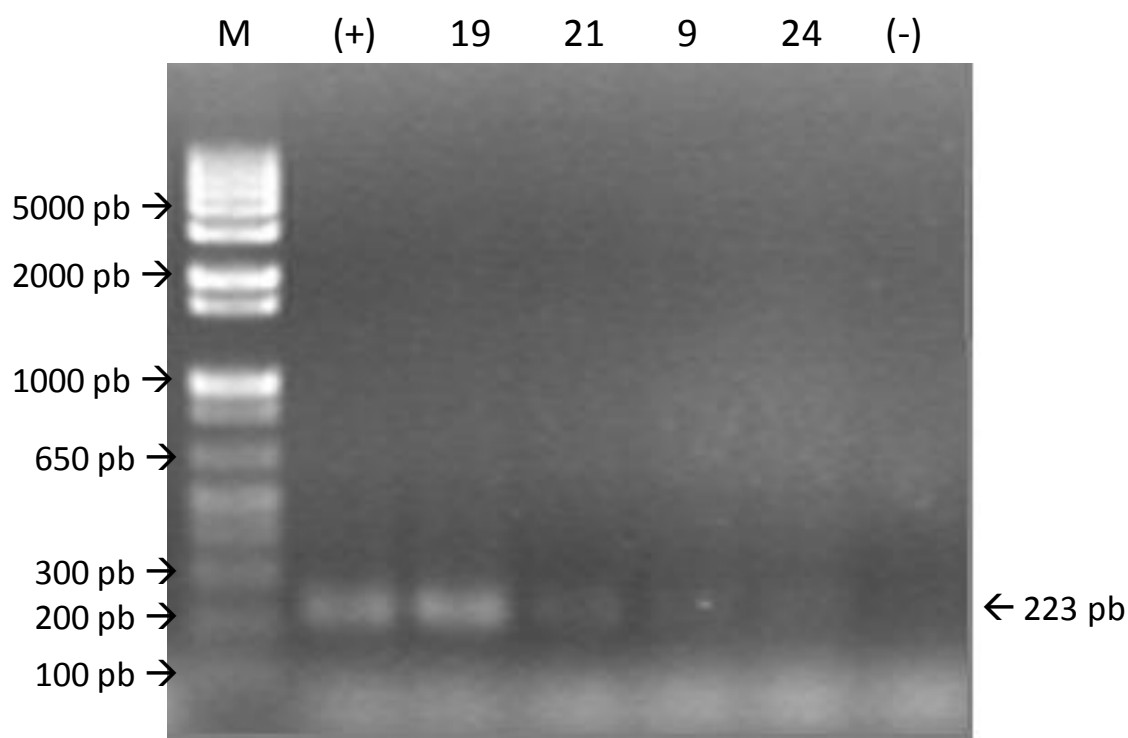


Figura 9. Fragmento amplificado por PCR *bscp31* para la detección de *Brucella* sp. a partir de DNA extraído de queso. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV (Carril 1. Marcador de talla molecular 1 kb plus. Carril 2 DNA de *B. abortus* 544. Carril 3 y 4 quesos del 1<sup>er</sup> muestreo. Carril 5 y 6 quesos del 2<sup>o</sup> muestreo. Carril 7. DNA *E. coli*.)

Imaoka *et al.* (2007) emplearon una combinación de iniciadores para la identificación de diferentes especies de *Brucella* y determinar así que la proteína de membrana BSCP31 es específica del género al probar los combinados con cepas de otros géneros bacterianos, especificidad confirmada en este estudio en donde se corrió DNA de *Escherichia coli* como control negativo y se observó que no se produjo ningún amplificado como se aprecia en la figura 10.

El diagnóstico bacteriológico que trae como fin último el aislamiento e identificación de *Brucella spp.*, es la prueba de oro para emitir un diagnóstico; sin embargo, esta metodología presenta limitantes, por lo que la PCR se ha convertido en una opción importante para la identificación de este agente debido a su sensibilidad y especificidad, así como por la reducción de tiempo para la identificación de la bacteria (Aguirre *et al.*, 2008; Padilla *et al.*, 2003). Estos beneficios pudieron demostrarse en la presente investigación al lograrse obtener amplificados específicos del género, de muestras de las que no se obtuvieron aislamientos bacterianos.

Los resultados obtenidos muestran que los quesos que se venden en la zona conurbada están elaborados con leche de unidades de producción afectadas con *Brucella spp.*, pues las hembras infectadas secretan la bacteria en la leche la cual pasa a la cadena de la producción de lácteos que no han sido pasteurizados (Acha y Szyfres 2003); sin embargo, si la carga bacteriana que procede de estos animales no es suficiente o durante el proceso de transformación de la leche se disminuyen las bacterias, la cantidad de éstas por ml o g de muestra puede ser insuficiente para su aislamiento, ya que serían necesarias al menos 1,000 UFC por ml o g de muestra. No obstante, el potencial para causar infección se conserva si en el producto existen al menos 100 UFC por ml o g (Martínez *et al.*, 2001; Martínez *et al.*, 2008; Pulido, 2010), situación que probablemente se dio en este estudio y que impidió su aislamiento en medios de cultivo, pero que pudo demostrarse a través de la PCR como se observa en la figura 10.

El estado de Veracruz se encuentra dentro de las 10 primeras entidades productoras de leche en México; sin embargo, Zenteno *et al.* (2007), señalan que existe una tasa

de brucelosis del 3%, lo que produce una deficiencia en la calidad de la leche y los productos lácteos que se elaboran a partir de ésta, situación que debería producir alerta en las autoridades de salud.

En la zona conurbada Veracruz, Boca del Río no existen registros sobre contaminación de quesos frescos, pero Martínez *et al.* (2009) realizaron un estudio en el municipio de Perote, Ver. para evaluar el medio de Farrell con leche de cabras que se ordeñan para producir quesos frescos e identificaron *Brucella melitensis*. No obstante que quesos de esa localidad, en apariencia, no se distribuyeron para su venta en los mercados estudiados, por la cercanía del lugar con la conurbación, no se puede descartar la posibilidad de que particulares consuman el producto, lo adquieran ó lo trasladen a otras zonas geográficas, lo que generaría una distribución mayor de la bacteria, sobre todo si se considera que 8/60 (13.33%; IC95%: 6.33 – 25.14) de las muestras carecen de datos de origen de procedencia como se presentó en la figura 2; situación de la mayor relevancia al carecerse de registro de la procedencia de los quesos que fueron positivos por PCR y que, por lo tanto, es una limitante para establecer el o los municipios que comprometen la salud de los consumidores con esta zoonosis y a su vez, conocer si en los sitios de origen existen reportes de brucelosis humana que pudiera asociarse con su consumo. En ese sentido, y si se considera el lugar de procedencia, se identificó *Brucella* spp. de 1/2 quesos de Soledad de Doblado (50%; IC<sub>95%</sub>: 2.67-91.33), de 1/4 de Jamapa (25%; IC<sub>95%</sub>: 1.32-78.06) y de 2/8 en los que se carece del dato de origen (25%; IC<sub>95%</sub>: 4.45-64.42).

Con respecto a la presencia de *Brucella* spp. por temporada, los amplificadores obtenidos correspondieron a ambas; es decir, dos para la de estiaje y dos para lluvias, lo que es posible que se deba a elaboración de los quesos con leche no pasteurizada contaminada con la bacteria (Barroso *et al.*, 2007), característica que permitió identificarla por PCR en las dos temporadas y en iguales proporciones.

Más aún, dada la baja cantidad de DNA del género *Brucella*, no se pudo identificar la especie, lo que constituye un interés epidemiológico mayor porque especies como *B. melitensis* y *B. suis* son más virulentas para el humano (Corbel, 2006).

### **3.3.2 *Listeria monocytogenes***

Para la identificación de *Listeria monocytogenes* se utilizaron los iniciadores LL7/1F y el LL8/1R (Omiccioli *et al.*, 2009) que permiten determinar género y especie y, de esta forma, obtener un amplificado de 173 pb; sin embargo, su uso en la presente investigación no permitió que se obtuvieran los amplificados esperados, resultado que lleva a suponer que las técnicas moleculares no siempre brindan los resultados deseados, ya que al igual que el diagnóstico bacteriológico convencional, presentan limitantes como ya ha sido señalado por Poutou *et al.* (2005), quienes indicaron que para identificar *Listeria monocytogenes* de quesos frescos por estas técnicas es necesaria una concentración bacteriana de al menos  $10^5$  UFC/g, misma que es posible que no estuviera presente en las muestras analizadas.

La caracterización microbiológica con pruebas bioquímicas convencionales aún en la actualidad, es la prueba de oro para la identificación bacteriana; sin embargo, los resultados que se obtienen a partir de estas metodologías, pueden arrojar resultados erróneos debido a diversos factores como son el depender de un buen enriquecimiento o, del número de microorganismos diferentes a *Listeria spp.* presentes tal como lo describe Manzano *et al.* (1997), lo que ha exhortado al uso de la PCR para la identificación de *L. monocytogenes*.

La sensibilidad de la técnica de PCR ya ha sido analizada por investigadores como Torres *et al.* (2004), quienes reportaron especificidad y sensibilidad altas para la técnica; sin embargo, en este estudio se aisló e identificó por bacteriología convencional una cepa de *Listeria monocytogenes*, la cual no fue posible hacerlo por PCR, lo que demuestra que la PCR propuesta por estos y otros investigadores, tiene que ser analizada, modificada y estandarizada para ser usada en otros laboratorios.

Existen aún fallas que se pueden observar al emplear la PCR en muestras de alimentos como pueden ser la errónea selección de iniciadores, los propios componentes de las muestras como hemoglobina, lactoferrina, polisacáridos, grasas

y/o proteínas, entre otros; por lo que González *et al.* (2005) han recomendado el uso de pre-enriquecimientos y membranas selectivas, procedimientos que no fueron realizados en esta investigación; sin embargo, como control interno para comparar los resultados que se obtuvieron de las cepas aisladas, se hizo uso de la cepa de referencia *Listeria monocytogenes* 19114, la cual tampoco mostró con la técnica realizada los amplificadores esperados, por lo que no se considera que los resultados que se obtuvieron en este trabajo se pudieran deber a errores en la selección de iniciadores o debidos a los componentes de los quesos. En este mismo sentido y para disminuir los errores en que se incurre al emplear la técnica de PCR, los laboratorios Europeos iniciaron el proyecto Food-PCR que propone procesos fáciles y específicos (Malorny *et al.*, 2003) para el empleo de la PCR en la identificación de patógenos en alimentos; sin embargo, todavía no se ha emitido ningún proceso validado derivado de esa investigación.

### **3.3.3 *Escherichia coli* O157:H7**

De las 9 muestras de queso donde se aisló e identificó *Escherichia coli* O157:H7 con el diagnóstico bacteriológico convencional, sólo una de las cepas (11.11%; IC<sub>95%</sub>: 0.58 - 49.33) por PCR amplificó para la Vtx2 (figura 13), situación que permite demostrar que los quesos frescos que se venden en la zona conurbada Veracruz, Boca del Río continen a la bacteria que es capaz de producir la toxina que puede comprometer la vida del consumidor.

Los métodos convencionales no siempre resultan ser eficaces para la recuperación de *E. coli* 157:H7 debido a la concentración en la que se encuentra la bacteria en la muestra, por lo que es difícil su aislamiento (Feng y Weagant, 2002). En la actualidad se emplean técnicas moleculares que permiten la identificación de los antígenos O y H; asimismo, se hace uso de esta técnica para la identificación de los factores de virulencia, como la Vtx1 y Vtx2 que se asocian con el desarrollo del SUH, en particular la Vtx2.



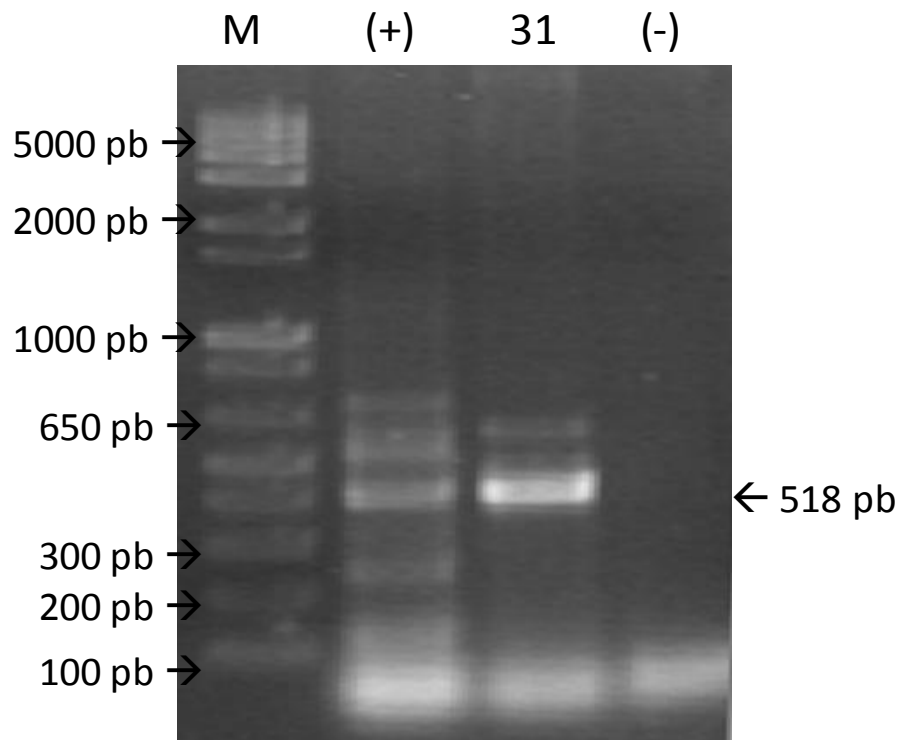


FIGURA 10. Amplificación por PCR Vtx2 para la detección de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de DNA extraído de queso. Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio y visualizado con luz UV. Carril 1 marcador de talla molecular 1 kb plus. Carril 2 DNA de *Escherichia coli* O157:H7. Carril 3 queso del 1<sup>er</sup> muestreo. Carril 4 DNA de *B. abortus* 544.

De las cepas identificadas por bacteriología convencional (15%; IC<sub>95%</sub>: 7.5 – 27.08) como *Escherichia coli* O157:H7, se confirmó por PCR 1/9 (11.11%; IC<sub>95%</sub>: 0.58-49.33) por su capacidad de producir Vtx2 al observar un amplificado de 518 pb que correspondió al gen que codifica para la verotoxina. De esta forma, la identificación de la bacteria por ambas metodologías, permite confirmar que la presencia de *Escherichia coli* O157:H7 se encontraría en concentración suficiente para causar enfermedad; sin embargo, también indica que con el diagnóstico bacteriológico convencional y la serotipificación de los antígenos somáticos "O" y flagelares "H" de las colonias aisladas que corresponden al serotipo O157:H7 de esta bacteria, es imposible demostrar si las cepas son capaces de sintetizar las toxinas Vtx1 y Vtx2 que

se relacionan con la virulencia, porque estas últimas son codificadas por la presencia de bacteriófagos insertados en el cromosoma bacteriano que podrían no estar siempre presentes en todas las cepas aisladas (Rivas *et al.*, 2007).

La PCR es una técnica que facilita la identificación a partir de concentraciones bajas de bacterias como lo demostraron Katto *et al.* (1993) y Lawson *et al.* (1998) quienes reportaron un límite de determinación de 10 UFC para obtener amplificadas. Asimismo, el uso de técnicas apropiadas para su extracción favorece la obtención, pues en esta investigación se empleó la técnica de extracción fenol-cloroformo recomendada por Shetab *et al.* (1998), que permitió evidenciarlos desde de una concentración de  $10^2$  a  $10^3$  células/g.

La cepa identificada por la PCR como *Escherichia coli* O157:H7 y que produce Vtx2, se aisló de una muestra de queso en la temporada de estiaje de uno de los establecimientos del mercado Unidad Veracruzana (14.29%; IC<sub>95%</sub> 0.75-58); sin embargo, se desconoce su sitio de manufactura (12.5%; IC<sub>95%</sub>: 0.66-53.32).; asimismo, la confirmación del microorganismo por esta metodología, deja expuesto que no se realizan análisis microbiológicos a los alimentos que se venden en sitios autorizados dentro de los mercados, lo que debería generar una alerta para los consumidores y autoridades, pues los primeros son quienes adquieren estos productos que pueden llegar a comprometer su salud en forma grave, en particular las personas más susceptibles para contraer la infección como son niños y adultos mayores, como lo ha señalado Prats *et al.* (1996) quienes estudiaron nueve pacientes que cursaban con enteritis ocasionada por *E. coli* O157:H7 e identificaron que las edades de los pacientes fueron extremas de 11 a 70 años.

En Veracruz se carece de reportes de personas afectadas por el SUH; sin embargo, a nivel internacional, Argentina es uno de los países con el mayor número de casos al año con infantes afectados menores de 5 años con una tasa de 8.7/100,000 como lo reporta Rivero *et al.* (2004). Por otra parte, la diversidad de signos y síntomas que presenta esta infección podría ser la causa de la ausencia de reporte en México, aún en presencia del agente, porque es posible que ante la falta de conocimiento y

entrenamiento de personal de salud en México y en particular del de Veracruz, se hagan diagnósticos equivocados y se emitan resultados negativos para esta bacteria ya que, para el diagnóstico, no sólo se requiere emplear las técnicas bacteriológicas convencionales y serotipificación, sino también de técnicas moleculares para identificar los factores de virulencia (Rivas *et al.*, 2006).

## CONCLUSIONES

4.1. Los microorganismo aislados por técnicas bacteriológicas convencionales de los quesos que se expenden en los mercados de la zona conurbada Veracruz – Boca del Río fueron 1/60 *L. monocytogenes* (1.6%; IC<sub>95%</sub>:0.09-10.14) y 9/60 *E. coli* O157:H7 (15%; IC<sub>95%</sub>:4.5-27.08).

4.2 No se encontraron diferencias para el aislamiento e identificación de ninguna las bacterias estudiadas para las temporadas de estiaje y lluvias.

4.3 *Brucella* spp. se identificó por PCR de 3/16 queserías del mercado Malibrán (18.75%; IC<sub>95%</sub>: 4.97-46.31) y 1/2 del mercado Abastos Boticaria (50%; IC<sub>95%</sub>: 2.67-97.33)

4.4 *Listeria monoytogenes* sólo aisló e identificó en 1/16 queserías del Mercado Malibrán (6.25%; IC<sub>95%</sub>: 0.33-32.29).

4.5 *Escherichia coli* O157:H7 se aisló de 4/16 queserías del mercado Malibrán (25%; IC<sub>95%</sub>: 8.33-52.59), en 4/7 del Unidad Veracruzana (57.14%; IC<sub>95%</sub>: 20.24-88.19) y 1/2 del Hidalgo (50%; IC<sub>95%</sub>: 2.67-91.33).

4.6 Por lugar de procedencia se identificó *Brucella* spp., de 1/2 quesos de Soledad de Doblado (50%; IC<sub>95%</sub>: 2.67-91.33), de 1/4 de Jamapa (25%; IC<sub>95%</sub>: 1.32-78.06) y de 2/8 en los que se carece del dato de origen (25%; IC<sub>95%</sub>: 4.45-64.42).

4.5 La cepa identificada como *Listeria monocytogenes* se aisló de 1/4 quesos cuyo origen fue Tenenexpan, municipio de Manlio Fabio Altamirano (25%; IC<sub>95%</sub>: 1.32-78.06).

4.6 *Escherichia coli* O157:H7 se aisló de 3/8 quesos procedentes de Tlalixcoyan (37.5%; IC<sub>95%</sub>: 10.24-74.11), 1/18 de Ignacio de la Llave o región de la Mixtequilla (5.56%; IC<sub>95%</sub>: 0.29-29.38) y de 5/8 se desconoció el lugar de procedencia (62.5%; IC<sub>95%</sub>: 25.89-89.76).

4.7 Sólo 1/9 cepas aisladas de *Escherichia coli* O157:H7 (11.11%; IC<sub>95%</sub>: 0.58-49.33) se identificó como productora de Vtx2, se aisló de una muestra de queso de 1/7 de los establecimientos del Mercado Unidad Veracruzana (14.29%; IC<sub>95%</sub>: 0.75-58) y cuya procedencia se desconoce (12.5%; IC<sub>95%</sub>: 0.66-53.32).

4.8 La técnica de PCR seleccionada para identificar *Listeria monocytogenes* no resultó de utilidad.

## REFERENCIAS

Abdul-Raouf U. M., Ammar M.S., Beuchat L.R. 1996. Isolation of *Escherichia coli* from some Egyptian foods. *Int. J. Food Microbiol*, 29:423-426.

Acha P.N., Szyfres B. 2003. Brucelosis. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. OPS. 3ª Edición, Washington, D.C., EUA. P.p. 28-56

Aguirre V.E.A., Alvarado M.G., Ibave J.L.G., Leal M.H., Díaz E.A., Nevárez G.V. M., Solís F.J.M., Arévalo S.G., Rivera B.E.C. 2008. Diagnóstico rápido y efectivo de brucelosis bovina en sangre, mediante una reacción en cadena de la polimerasa doble. *Téc. Pecu. Méx.*, 46(2):147-158.

Albarracín Y. C., Sarmiento P., Carrascal A.K. 2006. Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp en quesos frescos (queso de hoja y cuajada) y queso doble crema producido y comercializados en el municipio de Pamplona, Norte de Santander. *Rev. BISTUA Colombia*, 4(2):30-41.

Albarracín Y. C., Poutou R.P., Carrascal A.C. 2008. *Listeria* spp., y *Listeria monocytogenes* en leche cruda de cabra. *Rev. MVZ Córdoba*, 13(2):1326-1332.

Alton G.G.M., Jones L., Angus R.D., Verger J.M. 1988. "Las técnicas de los laboratorios en la brucelosis". Organización Mundial de la Salud. Segunda edición Ginebra suiza.

Ausbel F. M., Brent R., Kingstone E., Moore D., Seidman J., Smith J., Struhl K. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons. New York. Pp. 2.4.1-2.4.5

Baily, G.G., Krahn J.B., Drasar B.S., Stoker N.G. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. of Tropical Medicine and Hygiene*, 95(4):271-275.

Baquero A.D.M., Bernal A.M.G., Campuzano S. 2006. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos expendidos en la plaza del mercado de Cáqueza, Cundinamarca. *Nova. Publ. Cient.*, 4(6):1-114.

Barroso P.G., Lucerna M.A.M., Cortés M M., Toranzo M.L., Escabias F.J.M., Molina F.C. 2007. Brote de brucelosis interprovincial por ingesta de queso fresco sin higienizar. *Medicina Familiar. Esp.*, 2:27-32.

Berrang M.E., Meinersmann J.R., Northcutt K.J, Smith P.D. 2002. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry further processing facility and from fully cooked product. *Journal of Food Protection*, 65:1574-1579.

Baucheron S., Grayon M., Zygmunt M.S., Cloeckert A. 2002. Lipopolysaccharide heterogeneity in *Brucella* strains isolates from marine mammals. *Research in Microbiol.*, 153:277-280

Borucki M.K., Call D.R. 2003. *Listeria monocytogenes* serotype identification by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 41:5537-3340.

Bravo V.J.B., Villalobos de B.L.B. 2002. *Escherichia coli* enterohemorrágica en productos cárnicos comercializados en el mercado municipal de Cumaná, Venezuela. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* 22(2):119-121.

Brooks G.F., Batel, J.S., Morse, S.A. 2005. *Listeria monocytogenes*. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 18ª Edición. Manual Moderno. Pp. 214

Callejo R., Prieto, M., Martínez, C., Aguerre, L., Rocca, F., Martínez, G. 2008. Aislamiento, identificación y caracterización de *Listeria monocytogenes*. Centro Regional de Referencia del WHO Global Salm Surv para América del Sur. Pp. 5-7.

Candelo de A.N. 2004. Todo lo que se debe Saber sobre brucelosis en bovinos [En línea]  
[http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/ceniaphoy/articulos/n4/texto/ncandelo.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n4/texto/ncandelo.htm).

Castell M. J., Rullán J.V., Peiró E.F., Nieto-Sandoval A.A. 1996. Estudio de un brote epidémico de 81 casos de brucelosis consecutivo al consume de quesos sin pasteurizar. *Rev. Salud Pública*, 70(3):303-311.

Castro H.A., González S.R., Prat M.I. 2005. Brucelosis una revisión práctica. *Acta Bioqím. Clín. Latinoam.*, 39(2):203-216.

Chamorro M.C., Losada, M.M. 2002. El Análisis Sensorial de los Quesos. 1ª Ed. Mundi-Prensa Ediciones. Madrid España Pp. 26

Cicuta M.E., Deza N.R., Roibón W.R., Benitez M.C., Ramirez G.V., Arzú R.O. 2006. *Escherichia coli* productor de toxina Shiga em medias reses y carnes molidas bovinas. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas. [En línea] <http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/04-Veterinarias/2006-V-041.pdf>

Cristóbal R.L.D., Maurtua T.D.J. 2003. Evaluación bacteriológica de quesos frescos artesanales comercializados en Lima, Peru y la supuesta acción bactericida de *Lactobacillus* spp. *Pan. Am. J. Public Health*, 14(3):158-164.

Conedera G, Dalvit P, Martini M, Galiero G; Gramaglia M, Goffredo E. S. Mirabito, D. Ottaviana, Paterlini, F., Pzzotti, G., Pisanu, M., Semprini, P., Caprioli, A. 2004. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in minced beef and dairy products in Italy. *Int J Food Microbiol.*, 96:67-73.



Corbel M. J. 2006. Brucellosis in humans and animals. World Health Organization. Pp.4

D'Amico D.J., Groves E., Donnelly C.W. 2008. Low Incidence of Foodborne Pathogens of Concern in Raw Milk Utilized for Farmstead Cheese Production. *J. of food Protection*, 71(8):1580-1589.

De La Fuente L.G. 1993. Bacteriología Médica Diagnóstica. Instituto Politécnico Nacional. Dpto. Microbiología. Editada por IPN. México. Pp. 325-327.

Díaz E. A., Hernández A.L., Valero E.G. Arellano B. 2001. Diagnóstico de brucelosis animal. *Instituto nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. SAGARPA/IICA*. México D.F.

Dirección General de Epidemiología. 2010. Boletín epidemiológico. [En línea] <http://www.dgepi.salud.gob.mx>.

Doumith M., Buchrieser C., Glaser P., Jacquet C., Martin P. 2004. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 48(8):3819-3822.

Espinoza M.A. De la Torre B.M., Salinas F.M., Sánchez P.V. 2004. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica. *Med. Exp. Salud Pública.*, 21(002):71-75.

Ewalt D. R., Bricker B.B. 2000. Validation of the Abbreviated *Brucella* AMOS PCR as a Rapid Screening Method for Differentiation of *Brucella abortus* Field Strain Isolates and the Vaccine Strains, 19 and RB51. *J Clin Microbiol.*, 38(8): 3085-3086.

Faber J. M., Peterkin P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Rev. Microbiol.*, 55:476-511.

Feng P., Weagant D.S. 2002. Diarreheagenic *Escherichia coli*. Bacteriological Analytical Manual. Chap. 4a. U.S. Food and Drug Administration. Center for Food Safety and Applied Nutrition. U.S.A. [En línea]  
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM070080>

Flores L.J.L., Vélez A.M. 2002. Comunicación y Participación La experiencia de México. Foro Mundial FAO/OMS de autoridades de reglamentación sobre inocuidad de los alimentos. Marrakech, Marruecos. Enero. [En línea]  
<http://www.fao.org/docrep/meeting/004/y2122s.htm>

Foster G, Osterman B.S., Godfroid J., Jacques I., Cloeckaert A. 2007. *Brucella ceti* sp. nov. and *Brucella pinnipedialis* sp. nov. for *Brucella* strains with cetaceans and seals as their preferred hosts. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 57(11):2688-93.

Franco, M. P., Mulder M., Gilman R.H., Smits, H.L. 2007. Human brucellosis. *Lancet. Infection Disease*, 7(12):775-786.

Franco L.U., Vargas X.X.P., Mendoza I.A., Bayona M.R., Plaza A. 2001. Determinación de *Escherichia coli* O157 a partir de productos cárnicos y lácteos artesanales empleando dos sistemas de aislamiento. Pub. Universitas Scientiarum. Bogotá. [En Línea]  
[http://www.javeriana.edu.co/universitas\\_scientiarum/universitas\\_docs/VOL6N1/ART3.htm](http://www.javeriana.edu.co/universitas_scientiarum/universitas_docs/VOL6N1/ART3.htm)

Freer E., Castro A.R. 2001. *Brucella* una bacteria virulenta carente de los factores de virulencia clásica. *Rev. Costarrica. Cienc. Med.*, 22(12):73-82.

Gallegos J., Arrieta G., Máttar S., Poutou R., Trespalacios A., Carrascal, A. 2007. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos, *Rev. MVZ.*, 12(2):996-1012

Gallegos M., Morales A., Álvarez G, Vásquez J., Morales L, Martínez I., Maldonado J. 2009. Caracterización de aislados de *Escherichia coli* O157:H7 en canales de porcinos y bovinos mediante PCR. *Rev. Cien. FCV-LUZ.*, 19(2):139-146.

Gándara B., López A., Rigel M., Martínez-Romero E. 2001. Limited genetic diversity of *Brucella* spp. *J. Clin. Microbiol.*, 39:235-240.

Gómez D, Miliwebsky E, Fernandez P.C., Baschkier A., Manfredi E., Zotta M., Nario F., Piquin A., Sanz M., Etcheverria A., Padola N., Parma A., Rivas M. 2002. Aislamiento y caracterización de *Escherichia coli* productora de verotoxina de hamburguesas congeladas y quesos blandos. *Rev Argent Microbiol.*, 34(2):66-71.

González M.D., Garza F.H., Sánchez-Yáñez J.M. 2007. Contaminación de productos lácteos por *Brucella* spp y otras bacterias en el municipio Higuera, Nuevo León, México. [En línea] <http://www.monografias.com/trabajos33/brucellosis/>

González T., Rojas R.H.A. 2005. Enfermedades transmitidas por alimentos y PCR: prevención y diagnóstico. *Rev. Salud Pública de Méx.*, 47(5):388-390.

González C.A.F, Torres M.J.Ll., Ballego, B.C. 2004. Tecnificación del proceso artesanal para la obtención de queso fresco mexicano. Trabajo finalista del Premio Nacional en Ciencia y Tecnología en Alimentos. [ En línea]  
[http://www.pncta.com.mx/pages/pncta\\_investigaciones\\_04g.asp?page=04e3](http://www.pncta.com.mx/pages/pncta_investigaciones_04g.asp?page=04e3)

Hernández S.R. 2002. Brucelosis. *Rev. Med. U.V.* 2(2):35-38.

Heuvelink A.E., Zwartkruis-Nahuis T.M.J., Beumer R.R., de Boer E. 1999. Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in meats obtained from retail outlets in The Netherlands. *J Food Protect.*, 62:1115-22.

Hitchins D.A. 1998. BAM: Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Bacteriological Analytical Manual. 8<sup>th</sup> Edition. [En línea]  
<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/UCM071400>

Huguet J.T., Huapaya B.C., Salazar E.L. 2002. Determinación de factores de virulencia asociados a *Escheerichia coli* enterohemorrágica en cepas peruanas aisladas entre 1999-2001. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, 19(2):63-68.

Imaoka K., Kimura M., Suzuki M., Kamiyama T., Yamada A. 2007. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:137-139.

INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2010. Encuesta Industrial Mensual. [En línea] <http://dgcnesyp.inegi.org.mx/cgi-win/bdieintsi.exe/SER173532>

INIFAP. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. 2004. Manual para el diagnóstico de patógenos en lácteos y carnes mediante PCR. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional del Noreste. Campo Experimental General Terán. Pp. 83-85.

Iñiguez Palomares C. Detección y Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en Quesos Frescos por reacción en Cadena de la Polimerasa y Método Oficial. Tesis de Maestría. 2002. [En línea]  
<http://www.ciad.mx/boletin/enefeb2003/DeteccionyPrevalenciadeListeria.pdf>

Juárez M.T. 2008. Quesos Mexicanos toda una tradición. Reportajes. Fac. de Medicina Veterinaria y Zootecnia. [En línea]  
<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/reportajes/quesos/quesos.htm>.

Katto N.C., Ou C.Y., Kato H., Bartley S.L., Lou C., Killgore G.E., Ueno K. 1993. Detecction of toxigenic *Clostridium difficile* in stool specimens by the polymerase chain reaction. *J. Infec. Dis.*, 167:455-458.

Lagos L. A., Morales M.C., Castillo R. 2002. *Escherichia coli* O157:H7 patógeno emergente en Honduras. *Rev. Med. Honduras*, 70:21-23.

Lara Gutiérrez A. 2006. Evaluación de dos medios de cultivo para el aislamiento de *Brucella mellitensis* a partir de leche de cabras de la comunidad de Tenex-tepec, municipio de Perote. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz. Universidad Veracruzana, Julio.

Laval E. R. 2006. Contribución al estudio histórico de la brucelosis en Chile. *Rev. Chil. Infect.*, 23(4):362-366.

Lawson A. J., Shafi M.S., Pathak K., Stanley J. 1998. Detection of *Campylobacter* in gastroenteritis: comparison of direct PCR assay of faecal samples with selective culture. *Epidemiol. Infect.*, 121:547-553.

Leal-Klevezas D.S., Martínez-Vázquez I.O., García-Cantú J., López-Merino, A., Martínez-Soriano, J.P. 2000. Use of polymerase chain reaction to detect *Brucella abortus* biovar 1 in infected goats. *Veterinary Microbiology*, 75:91-97.

Leal-Klevezas, D; Martínez-Vásquez, I; López-Merino, A; Martínez-Soriano, J. 1995. Single step PCR for the detection of *Brucella* spp. From blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.*, 33:3087-3090.

Lecuona O.L.A., Domínguez O.J., Vargas P.F. 1997. Epidemiología de la Brucelosis. CONASA. México. [En línea] <http://www.conasamexico.org/>

LeJeune J.T., Besser T.E., Rice D.H., Berg R.P., Stilborn D.D. 2004. Longitudinal study of fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in feedlot cattle: Predominance and persistence of specific clonal types despite massive population turnover. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 70(1):377-384.

Leotta G.A., Chinen I., Epszteyn S., Miliwebsky M.I.C., Mttter M., Ferrer M., Marey E., Rivas M. 2005. Validación de una técnica de PCR Múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. *Rev. Arg. Microbiol.*, 7(1):1-10

Leynaud G.C., Reati G.J. 2009. Identificación de las zonas de riesgo ofídico en Córdoba, Argentina, mediante el programa SIGEpi. *Rav. Panam Salud Publica*, 26(1):64-69

Licata M. 2008. Los quesos. Composición, elaboración y propiedades nutricionales. [En línea] <http://www.zonadiet.com/comida/queso.htm>

Lin Z., Karazono H., Yamazaki S., Takeda Y. 1993. Detection of various variant Verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol Immunol.*, 37:543-548.

López M. A., Contreras R. A. 2006. Agentes Infecciosos. Brucella. *Rev. Latinoa. Microbiol.*, 48(2):146-153

López M.A. 2006. *Brucella*. Escuela de Ciencias biológicas, Instituto Politécnico Nacional. [En línea] <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/cap7/>

López-Merino A., Migranas-Ortiz R., Perez-Miravete A., Magos C., Salvatierra I.B., Tapia-Coyner R. 1992. Seroepidemiología de la Brucelosis en México. *Salud Publica Mex.* 34(2):210-230.

Malorny B., Hoorfar J., Bunge C., Helmuth R. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of Salmonella PCR: Towards an international standard. *Appl. Environ Microbiol.*, 69:290-296

Manzano M., Cocolin L., Cantoni C., Comi G. 1997. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* from milk and cheese by Single-Step PCR. *Molecular Biotechnology.*, 7:85-88

Martínez H.D.I., Abeledo G.M.A., Rodríguez C.M.A., Bautista B.R. Rivera R.E.L., Vallecillom M.A.J., Alpírez M.M., Acosta M.M., Acosta M.E.A, Luna M.J.E. 2001.

Aislamiento de *Brucella melitensis* biovar-1 en leche de cabras de la comunidad de Tenextepec, Municipio de Perote, Veracruz, Ver. *Rev Salud Anim.* 23(2):123-127

Martínez R.E., Villalobos L.B.B. 2004. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en atún fresco expedido en la ciudad de Cumaná, Venezuela. *Rev. Cien. Maracaibo.* 14(4):354-357

Martínez, V.I.O., Morales L.A., Mendoza D.L. G. 2004. Detección de *Brucella* spp en muestras de leche y queso. Manual para el diagnóstico de patógenos en lácteos y carnes mediante PCR. Folleto Téc. 5:83-85

Martínez H D.I., Villanueva M.V., Rivera A.G.N., Pulido E.C., Peniche A.C., Flores R.C., Morales J.F.A. 2008. Aislamiento de *Brucella* spp a partir de leche de vacas positivas a Pruebas serológicas. Avances en la Investigación Agrícola, Pecuaria Forestal y Acuicola en el Trópico Mexicano. Veracruz, México. Pp. 349-355.

Martínez H.D.I., Abeledo M.A., Lara A.G., Peniche A.C., Robledo M.L.S., Pulido E.C., Rosas T.J.S., Flores R.C. 2009. Evaluación de métodos de cultivo para el aislamiento primario de *Brucella melitensis* a partir de leche de cabras. *Rev Salud Anim.* 31(3):164-169.

Marzocca M.A., Marucci P.L., Sica M.G., Álvarez E.E. 2006. Detección de *Escherichia coli* O157:H7 en carne picada fresca y hamburguesas congeladas. *Rev. Arg. Microbiol.* 38:38-40.

Melgarejo Navarrete P. A. Serotipificación de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas desde alimentos distribuidos en la ciudad de Temuco, IX región. Tesis de licenciatura. Facultad de Agricultura y Ciencias Veterinarias. Universidad Católica de Temuco. Marzo, 2001. [En línea]  
<http://biblioteca.uct.cl/tesis/patricia-melgarejo/tesis.pdf>

Memish Z.A., Balky H.H. 2004. Brucellosis and international travel. *J. Travel Med.* 11:49-55.

Mercado E. C. 2006. Control de *Escherichia coli* enterohemorrágico (EHEC) en el ganado bovino. *Med. B. Aires.* 66:33-36.

Michanie S. 2003. *Escherichia coli* O157:H7 La bacteria que disparó el HACCP en la industria de la carne. [En línea]  
[http://www.bpm-haccp.com.ar/index\\_archivospdf/Escherichia-coli-O157-H7.pdf](http://www.bpm-haccp.com.ar/index_archivospdf/Escherichia-coli-O157-H7.pdf)

Montes I. 2004. Diagnóstico de la Brucelosis. Servicio de microbiología. Hospital Virgen del Puerto. Plasencia. CCS. [En línea] <http://www.seimc.org/control/>

Moreno-Enríquez R.I., García A.G., Acedo E.F., Díaz H.M.E. 2007. Detección de *Listeria monocytogenes* en la cadena de producción y comercialización de queso fresco. Alfa Editores. [En línea] <http://www.alfa-editores.com/web2>

Moreno J.F.R., Rentería T.B.E., Searey R.B., Montañó M.F.G. 2002. Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a brucelosis bovina en hatos lecheros de Tijuana, Baja California. *Téc. Pec. Méx.* 40(3):243-249.

Narváez-Bravo C. A., Carruyo-Nuñez G., Moreno M., Rodas-González A., Hoet A.E., Wittum T.E. 2007. Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 en muestras de heces de ganado bovino doble propósito del municipio Miranda, Estado Zulia, Venezuela. *Rev. Cient. (Maracaibo).* 17(3):239-245

Noriega L.M.R., Ibáñez S.V., González P.A., Yamamoto M.C., Astudillo J.D., González M.V., Riveros R.K., Lira F.C., Marcotti A.S., Pérez J.G., Thompson L.M., Daza M.F.P., Espinosa M.I., Pinochet C.V., Vial P.A.C. 2008 *Listeria monocytogenes*: Informe de un aumento de casos en mujeres embarazadas y revisión de la literatura. *Rev Chil Infect.* 25 (5):342-349

Ocha A. 2009. Brote de brucelosis por venta de queso contaminado en El Hidalgo. Correo. [En línea] <http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/>



OIE. Organización Internacional de salud Animal. 2000. Bovine brucellosis. *In: Manual of standards for diagnostic tests. List B diseases, Chapter 3.2.1.* Office International des epizooties. [ En línea] [http://www.OIE.int/norms/mmanual/A\\_00044.htm](http://www.OIE.int/norms/mmanual/A_00044.htm).

OIE. Organización Internacional de salud Animal. 2008. Enfermedades no consideradas en la lista A y B. *Listeria monocytogenes.* Chapter 2.10.14. Office International des epizooties. [ En línea] [http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.10.14\\_Listeria\\_monocytogenes.pdf](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.14_Listeria_monocytogenes.pdf)

Omiccioli E., Amagliani G., Brandi G., Bruce I.J., Magnani M. 2009. Simultaneous direct detection of salmonella spp., *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in milk samples by magnetic extraction and multiplex PCR. *J.RapidMethods & Automation in microbial.* 17:195-213

Oquendo Rodriguez M.M. Incidencia de *Escherichia coli* O157:H7 en carne proveniente de ganado bovino de mataderos de Puerto Rico. Tesis de Maestría. Programa de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Universidad de Puerto Rico. 2006 [En línea] <http://grad.uprm.edu/tesis/>

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (OPS). ABRIL 1994. Guía técnica para la Evaluación del riesgo microbiológico de los alimentos vendidos en la vía pública en ciudades de América Latina. PAHO/HCV/94/003. Abril

Oteo J.; Alós J.I. 1994. *Listeria* y listeriosis. Informe del Control de Calidad SEIMC. Servicio de Microbiología. Hospital de Mósteles. Madrid. [En línea] [http://www.seimc.org/control/revi\\_Bacte/listeria.htm](http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm)

Padilla C. R., Montoya Y.P., Carrillo C.P. 2003. Estandarización de una prueba de PCR para la detección de *Brucella* spp. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud. Pública.* 20(2):102-104

Pappas G., Akritidis N., Bosilkovski M., Tsísanos E. 2005. Medical progress: Brucellosis. *N. Engl. J. Med.* 352(22):2325-2336.

Pappas A., Papadimitriou P., Akritidis N., Christou L., Tsianos E. V. 2006. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.* 6:91-99.

Pascual A.M.R., Calderón P.V. 2000. Microbiología Alimentaria. 2ª Edición. Editorial Díaz de Santos. Madrid España. Pp.35

Pietro Di.S., Haritchabalet K., Cantoni G., Iglesias L., Mancini S., Temperoni A., Labanchi J.L., García M.T., Cofre M., Rosales S., Herrero E., Bigatti R., Orellana O., Larrieu E. 2004. Vigilancia epidemiológica de enfermedades transmitidas por alimentos en la provincia de Rio Negro, Argentina, 1993-2001. *Medicina Buenos Aires.* 64:120-124.

Posfay-Barbe, W.E.R. 2004. Listeriosis. *Pediatr. Rev.* 25:151-156.

Poutou R., Burbano M., Sierra S., Torres K., Carrascal K., Mercado M. 2005. Estandarización de la Técnica de extracción de ADN y validación de la PCR Múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Rev. Fac. Cinec. Bogotá.* 10(2):61-78.

Prats G, Frías C., Margall N., Llovet T., Gaztelurrutia L., Elcuaz R., Canut A., Bartolome R.M., Torroba L., Dorronsoro I., Blanco J., Blanco M., Rebella N., Coll P., Mirellis B. 1996. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clín.* 14:7-15

PROFECO. Revista del consumidor. 2000. Calidad de queso. Abril. [En línea] [http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est\\_00/quesos.pdf](http://www.profeco.gob.mx/revista/pdf/est_00/quesos.pdf)

Pulido Camarillo E.2010 El embrión de pollo como modelo de infección por *Brucella* spp., a partir de leche de bovinos infectados. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz. Universidad Veracruzana.

Ramírez M., Morier L., Alonso J., Bravo L., Cabrera R., Fernández A. 1999. Determinación de verotoxinas en cepas de *Escherichia coli* O157:H7. *Rev. Med. Trop.* [En línea]  
[http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttex&pid=SO37507601999000300002](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttex&pid=SO37507601999000300002)

Renaldi J.F., Santos E.M.P., Arcuri E.F., Lange C.C., Brito M.A.V.P., Souza G.N., Cerqueira M.M.P.O., Soto J.M.B., Call J.E., Liu Y., Porto-Fett A.C.S., Luchansky J.B. 2008. Retail survey of brazilian milk and Minas Frescal cheese and acontaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology.* 74(15):4954-4961

Renteria T.B, Organes E. H. de los S., Fedorovich A.L.N., Medina G.E.B., Nielsen K., Montañó M.F.G., Moreno J.F.M., Pujol L.C.M. 2005. Evaluación de la prueba en reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de muestras de leche y cultivos puros en el diagnóstico de la brucelosis bovina. *Téc. Pecu. Méx.* 43(1):117-126

Rivas M., Miliwebsky, E., Chinen I., Deza N., Leotta G. A. 2006. Epidemiología del Síndrome Uremico hemolítico en argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Medicina. Buenos Aires. Arg.* 66(3):27-32

Rivas M., Miliwebsky E., Deza N. 2007. Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* O157 productor de toxina Shiga a partir de especímenes clínicos. Manual de procedimientos. WHO Global Salam Surv. Pp. 2,7

Rivers R., Andrews E., González-Smith A., Donoso G., Oñate A. 2006. *Brucella abortus*: inmunidad, vacunas y estrategias de prevención basadas en ácidos nucleicos. *Arch. Med. Vet.* 38(1):7-18

Rivero M.A., Padola N.L., Etcheverria A.I., Parma A.E. 2004. *Escherichia coli* enterohemorrágica y síndrome urémico hemolítico en argentina. *Medicina. Buenos Aires. Arg.* 64(4):352-356.

Robinson R.K., Wilbey R.A. 2002. Fabricación de quesos. 2ª Ed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. Pp. 1

Rodríguez M.Z., Solera J.S., Sánchez M.L., Álvarez-Mon S.M. 1998. Brucelosis. Aspectos patogénicos. Clínica, diagnóstico y tratamiento. Formas específicas de la enfermedad. *Medicine*. 7(79):3651-3658

Rodríguez G.A. 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salu. Pub. Méx.* 44(5): 464-475.

Roldan M.L., Chinen I., Otero J.L., Miliwebsky E.S., Alfaro N., Burns P., Rivas M. 2007. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. *Rev. Argent. Microbiol.* 39(2):113-119.

Romero R.C. 1999. *Escherichia*. Microbiología y Parasitología humana Bases etiológicas de enfermedades humanas. 2ª Ed. Editorial Panamericana S.A.de C.V. México DF. Pp. 291

Romero C., López-Goñi I. 1999. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(8):3735-3737.

Romero C., Gamazo C., Pardo M., López-Goñi I. 1995. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. *J. of Clinical Microbiology*. 33(3):615-617.

Rossi M.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. *Rev. Chil. Infect.* 25(5):328-335

Saltijeral, J. A., Álvarez V.B., García B. 1999. Presence of *Listeria* in Mexican cheese. *J. Food Saf.* 19:241-247.

Samartino L. 2003. Conceptos generales sobre brucelosis bovina. Página 1. Jornada de actualización sobre brucelosis bovina. Argentina. [En línea]  
<http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Capacitaci%C3%B3n/JornadasBrucelosis/ConceptosGeneralesDrSamartino.pdf>

Sánchez T.N. 1997. *Eschericia coli* O157 H:7. Aspectos generales. RTV [En línea]  
<http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/vigilancia/rtv0997.pdf>

Sánchez F.J.V., Mata V.T., Espinoza A.M., Villareal L.T. 2006. Incidencia de especies de *Listeria* em uma planta productora de alimentos congelados. *Ciencia UANL*. México. 9(1):51-56

Santos A.M. 2006. Elaboración a pequeña escala de quesos mexicanos con leche pasteurizada. Primer simposio de leche. Chihuahua. Chihuahua. Octubre. [En línea]  
<http://201.131.19.30/Estudios/lacteos/Elaboacion%20a%20Peque%C3%B1a%20Escala%20de%20Quesos%20Mexicanos%20con%20Leche%20Pasteurizada.pdf>

Schöbitz R, Marin M., Horzella M., Carrasco E. 2001. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro Sur*. 29(2):114-119.

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

Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA). 1998. Norma Oficial Mexicana NOM-143-SSAI-1995. Método de prueba microbiológico para alimentos: Determinación de *Listeria monocytogenes*. Bienes y servicios Secretaria de Salud México. Normas Oficiales Mexicanas [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/>

Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA). 1996. NOM-121-SSA1-1994. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias. Bienes y Servicios, Secretaría de Salud México. Normas Oficiales Mexicanas [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/>

Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA). 1995a. Norma Oficial Mexicana NOM - 022-SSA2-1994. Para la prevención y control de la brucelosis en el hombre, en el primer nivel de atención. Secretaría de Salud México. Normas Oficiales Mexicanas [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/>

Secretaría de Salubridad y Asistencia (SSA). 1995b. Norma Oficial Mexicana NOM-110-SSAI-1994. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico. Bienes y Servicios Secretaría de Salud México. Normas Oficiales Mexicanas [En línea] <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/>

Shetab, R., Cohen S.H., Prindiville T., Tang Y.J., Cantrell M., Rahmani D., Silva J.Jr. 1998. Detection of *Bacteroides fragilis* enterotoxin gene by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 36:1729-1732.

Sim J., Hood L., Finnie M., Wilson G., Brett H. 2002. Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non invasive febrile gastroenteritis involving ready to eat meats. *Applied. Microbil.* 35:409-413

Sóstenes E.V.F., Martínez, G.J.L. 2006. Seguridad e inocuidad alimentaria para México. *Rev.Digi.U@T.* 1(1) [En línea] <http://www.turevista.uat.edu.mx/INOCUIDAD.htm>

Sistema Único Automatizado de Vigilancia Epidemiológica (SUAVE.). 2009. V Informe de gobierno Veracruz. [En Línea] <http://portal.veracruz.gob.mx/pls/portal/docs>

Stuart W.T. 1998a. Microbiología. *Listeria monocytogenes*. MacGrawl Hill. Interamericana. Pp. 214-218

Stuart W.T. 1998b. Microbiología. *Escherichia coli*. MacGrawl Hill. Interamericana. Pp. 161-168

Tizzard, I. R. 2004. "Veterinary Immunology: an introduction". 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders. Pp. 494.

Thrusfield M. 2005. Veterinary Epidemiology. 3rd Edition. Blackwell Science, Oxford, England. Pp 600

Thrusfield M., Ortega C., de Blas I., Noordhizen J.P., Frankena K. 2001. Win Episcopo 2.0: Improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148:567-572

Torres K., Poutou A., Carrascal, A.K., Sierra S.C., Mercado M. 2004. Validación de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne cruda de res y pollo. *Rev MVZ. Cordoba.* 9 (2):414-427.

Torres K., Sierra S., Pouto R., Carrascal A., Mercado M. 2005 Patogenesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonotico emergente. *Rev MVZ. Cordoba.* 10(1):511-543

Vargas A. C., Cervantes F.E., Pérez S.L.S. 2008. Los quesos mexicanos genuinos de Chiautla, Puebla, México. IV Congreso internacional de la red SIAL. [En línea] <http://www.infoagro.net/shared/docs/a5/Los%20quesos%20mexicanos%20genuinos%20de%20Chiautla%20-%20Mexico%20-.pdf>

Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel, W., Gonza B., Wehland L.Z.J., Kreft J. 2001. *Listeria* Pathogenesis and molecular virulence determinants. *Rev. Clin. Microbiol.* 14:584-640

Vernozy-Rozand C., Mazuy-Cruchaudet C., Bavai C., Montet M.P., Bonin V., Dernburg A. 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. *Int J Food Microbiol.* 105:83-88.

Vidal O.M., Carreño C.M., Vidal A.R., Arellano C.C., Solari G.V., Prado J.V. 2002. Evaluación de técnicas moleculares e inmunoenzimáticas para la detección de E coli enterohemorrágico en brotes de toxi-infecciones alimentarias. *Rev. Med.* 130(6):603-609

Villalobos de B.L.B., Martínez R.R.E.N. 2007. Aislamiento e identificación por métodos convencionales y PCR de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos frescos comercializados en Cumana, Venezuela. *Rev. Cient. Mar.* 17(5):529-536

Villanueva E.U. 2002. *Listeria monocytogenes* en quesos frescos comercializados en 5 mercados de expendio en Lima. VII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los alimentos. Santiago de Chile. 10 – 14. Noviembre. Chile. I-07.

Villamarín-Vásquez JL, Chiva-Nevot F., Arnedo-Pena. 2002. A. Seroprevalencia de la brucelosis en trabajadores agrícolas de las comarcas costeras de Castellón España. *Salud Publica.* 44(2):137-139.

Vitas, A.I., García-Jalon V.A. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). *Int. J. Food Microbiol.* 90(3):349-356.

Yeager H., Lacy J., Smith L.R., LeMaistre C.A. 1967. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. *Am. Rev. Respir. Dis.* 95(6):998-1004.

Zhang W., Hughes A., Wilt G., Knabel S.J. 2004. The BAX PCR assay for screening *Listeria monocytogenes* targets a partial putative gene *Imo2234*. *J. Food Prot.* 67:1507-1511



Zenteno, R.G., Limón, E.D.G., Martínez, M.G.S., Vitela, I.M., Flores, R.C., Martínez, D.I.H., Morales, J.F.A. 2007. Análisis del perfil serológico de enfermedades abortivas en diferentes establos lecheros CENID-Microbiología animal, INIFAP; instituto tecnológico el llano, Aguascalientes; FMVZ, Universidad Veracruzana. XIII Reunión nacional de investigación pecuaria Sinaloa. Octubre.