

# AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* EN QUESOS FRESCOS NO PASTEURIZADOS DE UNA ZONA TROPICAL DEL GOLFO DE MÉXICO

Isolation and identification of *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* in unpasteurized fresh cheeses from a tropical region of the Gulf of Mexico

Rosa Lilia Guzmán-Hernández<sup>1</sup>, Rosa Margarita Hernández-Velez<sup>2</sup>, Aurea Itzel Morales-Estrada<sup>1</sup>, Elizabeth Fernández-Rendón<sup>1</sup>, Ahidé López-Merino<sup>1</sup> y Araceli Contreras-Rodríguez<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional. Prol. Carpio y Plan de Ayala s/n, Col. Sto. Tomás, CP 11340. México, D.F. <sup>2</sup>División de Estudios de Posgrado e Investigación. Instituto Tecnológico de Villahermosa. Carretera VHSA-Frontera Km 3.5 CP 86010. Villahermosa, Tabasco, México. \*Número de teléfono: 011-52-5557296000 ext. 46209, fax: 011-52-5557296207, e-mail: araceliccontreras21@gmail.com

## RESUMEN

*Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *Staphylococcus aureus* son los principales microorganismos involucrados en brotes asociados al consumo de quesos. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar *Brucella* spp., *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *S. aureus*, en quesos frescos no pasteurizados de una zona tropical del Golfo de México. Un total de 52 muestras de quesos frescos no pasteurizados provenientes de Tabasco, México fueron analizadas para investigar la presencia de microorganismos patógenos por métodos microbiológicos. Adicionalmente, se realizó la identificación molecular del género *Brucella*, por medio de la amplificación del gen *bcs31*. Los genes *prfA* y *hlyA* fueron amplificados para la identificación de *L. monocytogenes*, y se realizó la determinación de cepas de *S. aureus* productoras de enterotoxinas. Se identificó *B. abortus* en el 11% de las muestras, *L. monocytogenes* en el 2% y *Salmonella* serogrupo E en el 4%. *S. aureus* se aisló en el 36% de las muestras, de las cuales, en el 17% se identificaron cepas productoras de enterotoxinas. Se demostró que los quesos frescos pueden actuar como vehículo en la transmisión de *Brucella* y de otros patógenos, representando un riesgo potencial al consumidor. El uso de leche pasteurizada y adecuadas prácticas de higiene en el procesamiento de la leche y sus derivados son herramientas para mejorar la calidad microbiológica de estos productos.

**Palabras clave:** Quesos; no pasteurizados; brotes de alimentos; patógenos.

## ABSTRACT

*Brucella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus* are four of the most important pathogens associated with cheeseborne outbreaks. The aim of this study was to isolate and identify *Brucella* spp., *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *S. aureus* from fresh unpasteurized cheeses from a tropical region of the Gulf of Mexico. A total of 52 fresh unpasteurized cheeses from Tabasco, Mexico were analyzed for the presence of these microorganisms using conventional microbiological tests. Moreover, *Brucella* spp. was identified by the amplification of *bcs31* gene by polymerase chain reaction (PCR). For the identification of *L. monocytogenes*, the virulence factors; *prfA* and *hlyA* genes were amplified by PCR. Staphylococcal enterotoxins were determined in *S. aureus* strains. *B. abortus* was identified in 11% of the samples, *L. monocytogenes* in 2%, and *Salmonella* serogroup E in 4%. *S. aureus* was isolated from 36% of the cheese samples, whereas only, 17% of the samples contained *S. aureus* enterotoxigenic strains. This work further demonstrated that fresh cheeses might act as an important vehicle of transmission of *Brucella* and other pathogens. The presence of these pathogens is a potential public health risk. The use of pasteurized milk and proper hygienic practices in the processing of milk and dairy products are tools to improve the microbiological quality of these products.

**Key words:** Cheeses; unpasteurized; foodborne outbreaks; pathogens.

## INTRODUCCIÓN

El consumo de quesos frescos elaborados de forma artesanal es una práctica frecuente en varios países, en los cuales, a pesar de la modernización de la industria alimentaria, aún forma parte de la cultura regional gastronómica. Los quesos frescos se caracterizan por tener una consistencia suave, alto contenido de agua, baja concentración de sal, y con aroma y sabor a leche [21,32]. Cerca de 38 tipos de quesos se producen en México, de los cuales el 80% son frescos y la mayoría producidos a partir de leche cruda, no pasteurizada [16]. Existen reportes que señalan, que el consumo de quesos frescos elaborados con leche no pasteurizada representa un factor de riesgo para la salud, ya que pueden contener patógenos que de origen se encuentran en la leche de animales enfermos [22].

Varios brotes de enfermedades asociados al consumo de quesos se han reportado en los Estados Unidos, Francia, España y otros países alrededor del mundo [9, 10, 13, 27]. Gould y col. [17] en un estudio retrospectivo, analizaron los brotes asociados al consumo de quesos en los Estados Unidos entre 1998 y 2011. Reportaron un total de 90 brotes, de los cuales 38 fueron asociados al consumo de quesos no pasteurizados, en donde *Salmonella* fue el patógeno más frecuente, seguido de los géneros *Campylobacter*, *Brucella* y *Escherichia coli* O157:H7. Cerca del 40% de los brotes debido a quesos no pasteurizados fueron asociados con quesos importados de México. Otros patógenos que pueden encontrarse en quesos frescos son *Staphylococcus aureus*, de particular interés aquellas cepas productoras de enterotoxinas y *Listeria monocytogenes*, que produce listeriosis [36].

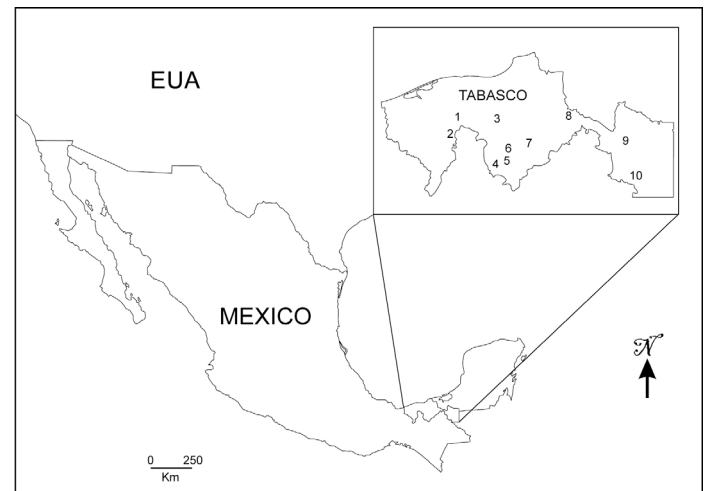
*Brucella* se considera una de las bacterias más virulentas. Las especies del género *Brucella* infectan diferentes especies de animales y el humano es considerado un hospedador accidental [15]. Este patógeno se transmite a las personas principalmente a través del consumo de leche o derivados lácteos no pasteurizados [25]. *Brucella* genera una enfermedad aguda febril (Fiebre de Malta) debilitante que puede evolucionar a una forma crónica debido a que es un patógeno intracelular facultativo, lo cual dificulta su tratamiento y su eliminación [15].

El Estado de Tabasco localizado en la zona costera del Golfo de México, es un Estado cuya economía se basa principalmente en la ganadería. Alrededor de 46,5 millones de litros de leche de vaca (*Bos taurus*) se destinan a la producción de quesos en Tabasco, de los cuales, la mayoría son producidos de manera artesanal [7] y son vendidos en mercados locales o en supermercados. Debido a que estos productos se producen y se venden sin ninguna regulación sanitaria que involucre estudios microbiológicos, se desconoce la prevalencia de los patógenos presentes en ellos. Es por ello que en el presente trabajo se realizó el aislamiento e identificación de *Brucella* spp., *L. monocytogenes*, *Salmonella* spp. y *S. aureus* en quesos frescos no pasteurizados producidos en Tabasco, México.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicado en la zona tropical del país, Tabasco colinda con los estados de Campeche, Chiapas y Veracruz, con el Golfo de México al norte y Guatemala al sur. El Estado de Tabasco, se localiza entre las coordenadas geográficas 17° 15' y 18° 39' LN del trópico de cáncer y entre 90° 59' y 94° 07' LO del meridiano de Greenwich [19]. Cuenta con un clima cálido húmedo, siendo la temperatura media anual de 27°C, con una temperatura máxima promedio de 36°C y una mínima promedio de 18°C. A diferencia de otros Estados de México, Tabasco cuenta con abundantes precipitaciones durante todo el año, con un promedio anual de 2,550 mm<sup>3</sup> [19].

Un total de 52 muestras de quesos frescos de diferentes marcas comerciales, elaborados con leche de vaca fueron recolectados de diez de los 17 Municipios del Estado de Tabasco (FIG. 1). Se recolectaron quesos de forma aleatoria durante los meses de febrero a agosto del 2011, en diferentes puntos de venta; supermercados, mercados locales, almacén y directamente de queserías artesanales. Las muestras se trasladaron al laboratorio de Microbiología General de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas a temperatura de refrigeración 4-8°C, en cavas con hielo.



**FIGURA 1. MAPA DEL ESTADO DE TABASCO Y MUNICIPIOS DE RECOLECCIÓN. MUNICIPIOS: 1 CÁRDENAS, 2 HUIMANGUILLO, 3 CENTRO, 4 TEAPA, 5 TACOTALPA, 6 JALAPA, 7 MACUSPANA, 8 JONUTA, 9 BALANCAN Y 10 TENOSIQUE.**

### Aislamiento e identificación de *Brucella*

De cada muestra de queso se pesaron 25 gramos (g) y se adicionaron a 100 mL de caldo soya tripticasa (TSB) suplementado con una mezcla de antibióticos, preparado según las indicaciones del fabricante (Oxoid *Brucella* Supplement) (OXOID, Reino Unido). Las muestras fueron homogenizadas en un homogenizador Stomacher (Seward, 400 Circulator, Seward, Reino Unido) a 18,000 xg por 40 segundos (s) en bolsas estériles (Whirl-Pak, EUA). Las muestras se transfirieron a botellas con tapa de cierre hermético y se incubaron en agitación (Thermo

Scientific, MaxQ2000, Fisher Scientific, EUA) a 37°C por 48 horas (h). Posteriormente se tomaron 0,5 mL y se sembraron en placas con medio selectivo Farell. Las placas se incubaron (LabTech, LCO-266 AIP, Daihan LabTech, Korea) por un período de 2 a 14 días (d) en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C. Se seleccionaron las colonias con fenotipo característico a *Brucella* y se les realizó las siguientes pruebas: tinción de Gram, oxidasa, catalasa, producción de ureasa y H<sub>2</sub>S, crecimiento en fucsina y tionina, sensibilidad a fagos y aglutinación con sueros mono-específicos [1].

A partir de las cepas aisladas se realizó la extracción del ADN utilizando el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) [28]. La identificación molecular de los aislados de *Brucella* se realizó mediante la amplificación del gen *bcsp31* (producto de amplificación de 223 pb), que codifica para una proteína antigénica de 31 kDa específica del género *Brucella*, utilizando el termociclador (BIO-RAD, MyCycler™ Thermal Cycler, BIO-RAB Laboratories Inc., EUA) [3]. Las cepas de referencia *B. abortus* ATCC 23448 y *B. melitensis* ATCC 23456 fueron utilizadas como control positivo. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis horizontal con geles de agarosa al 1,5%. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un fotodocumentador de geles (DNR Bio-Imaging Systems, MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Israel).

#### Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*

Para el aislamiento de *L. monocytogenes* se pesaron 25 g de muestra en bolsa estéril (Whirl-Pak, EUA) a la cual se le adicionaron 100 mL de caldo de enriquecimiento con suplemento para *Listeria* (DIFCO, EUA). Las muestras se homogenizaron, utilizando un homogenizador Stomacher (Seward, 400 Circulator, Seward, Reino Unido) a 18,000 xg por 40 s. Se colocaron las muestra en botellas con tapa de cierre hermético y se incubaron (LabTech, LIB-150M, Daihan LabTech, Korea) a 35°C por 48 h. Posteriormente, 0,5 mL de las muestras se sembraron en medio selectivo Oxford (DIFCO, EUA) preparado según las indicaciones del fabricante (Oxoid *Listeria* Supplement) (OXOID, REINO UNIDO). Las placas sembradas fueron incubadas por 48 h a 37°C. A las colonias con morfología característica de *Listeria* se les realizó tinción de Gram, prueba de movilidad, catalasa y hemólisis.

La identificación molecular de la especie *L. monocytogenes* se realizó mediante la amplificación de los genes *prfA* (producto de amplificación de 217 pb), y *hlyA* (producto de amplificación de 173 pb), los cuales codifican para una proteína activadora transcripcional de factores de virulencia y para la toxina listerolisina O, respectivamente [2, 14], utilizando el termociclador (BIO-RAD, MyCycler™ Thermal Cycler, BIO-RAB Laboratories Inc., EUA). Se utilizó la cepa de referencia de *L. monocytogenes* ATCC 9525. Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis horizontal con geles de agarosa al 1,5%. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un fotodocumentador de geles (DNR Bio-Imaging Systems, MiniBIS Pro, DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Israel).

#### Aislamiento de *Salmonella* spp. e identificación serológica

Se adicionaron 25 g a 225 mL de agua peptonada para su homogenización. Las muestras fueron transferidas a botellas con tapa de cierre hermético e incubadas (LabTech, LIB-150M, Daihan LabTech, Korea) a 37°C por 24 h. Posterior a la incubación, 1 mL de la muestra fue transferido a 10 mL de caldo selenito-cisteína y 1 mL a 10 mL de caldo tetratonato. Ambos medios fueron incubados a 37°C. Después de 24 h se tomó una asada de cada medio y se sembró por estría cruzada en los medios agar *Salmonella-Shigella*, agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y agar Entérico Hektoen incubándose a 37°C por 24 h. De tres a cinco colonias con morfología característica a *Salmonella* fueron seleccionadas de cada medio para su identificación bioquímica con las pruebas de Triple Azúcar Hierro (TSI), agar Lisina Hierro (LIA) y producción de ureasa. Se realizó la identificación serológica, utilizando suero polivalente AI+Vi y suero monovalente de los grupos B, C, D, y E (BD Bioxon, México).

#### Aislamiento de *Staphylococcus aureus* e identificación de cepas enterotoxigénicas

Para el aislamiento de *S. aureus*, 10 g de muestra fueron adicionados a 90 mL de buffer de fosfatos y se homogenizaron, utilizando un homogenizador Stomacher (Seward, 400 Circulator, Seward, Reino Unido) a 18,000 xg por 40 s. Se realizaron diluciones seriadas decimales a partir del homogenizado. Se tomaron 0,1 mL de cada dilución y se sembraron en placas de agar Baird-Parker (BPA) suplementado con telurito de potasio y emulsión de yema de huevo. Las placas fueron incubadas (LabTech, LIB-150M, Daihan LabTech, Korea) a 37°C por 48 h. Se seleccionaron aquellas colonias negras con halo transparente, para posteriormente realizar las pruebas de tinción de Gram, coagulasa, termonucleasa y manitol para la identificación de *S. aureus*.

Para la identificación de cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas se utilizó el kit comercial: The 3M Tecra Staphylococcal Enterotoxin ID Visual Immunoassay (3M Health Care, EUA), siguiendo las indicaciones señaladas por el fabricante.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 52 muestras de quesos frescos no pasteurizados fueron recolectados de supermercados (6/52), mercados locales (17/52), almacén (16/52) y directamente de queserías artesanales (13/52) (TABLA I).

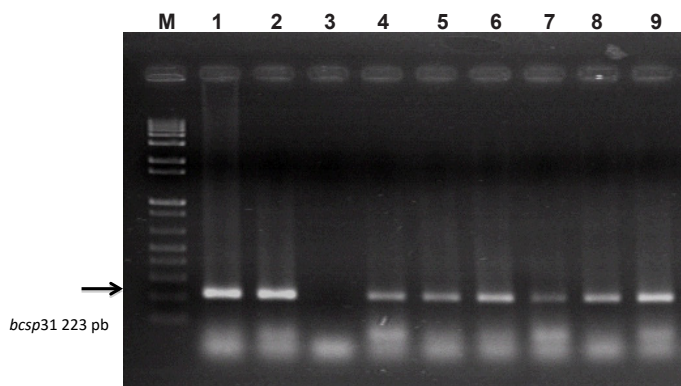
Un total de 46 cepas presuntivas a *Brucella* fueron obtenidas, y solo seis cepas fueron identificadas microbiológica y molecularmente, como *Brucella*, siendo *B. abortus* la especie identificada (FIG. 2).

Una cepa de *L. monocytogenes* fue aislada e identificada microbiológica y molecularmente mediante la amplificación de los genes *prfA* y *hlyA* (FIG. 3).

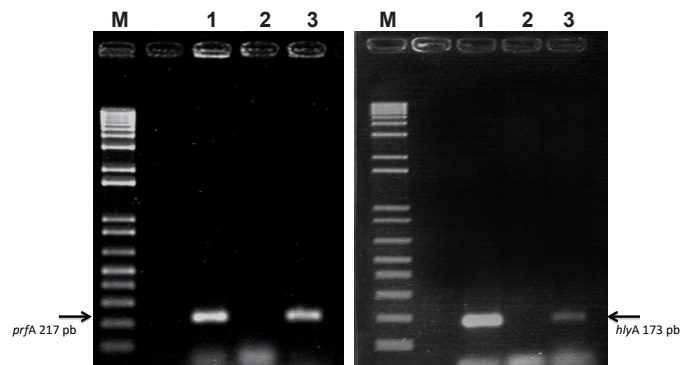
*Salmonella* spp. fue aislada de dos muestras. Ambas cepas fueron identificadas serológicamente como *Salmonella* serogrupo E.

**TABLA 1**  
**DISTRIBUCIÓN DE PATÓGENOS AISLADOS DE QUESOS FRESCOS NO PASTEURIZADOS**

Punto de Venta	Número de muestras de quesos frescos positivas a patógenos				
	<i>Brucella</i> spp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> enterotoxigénicos
Mercados locales (n=17)				5	2
Almacén (n=16)	1		1	6	1
Supermercados (n=6)	3	1	1	2	2
Queserías artesanales (n=13)	2			6	4
Total de muestras positivas a patógenos	6	1	2	19	9
Porcentaje de muestras positivas a patógenos	11%	2%	4%	36%	17%



**FIGURA 2. CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE PRODUCTOS DE PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *Brucella* SPP. M MARCADOR DE TALLA MOLECULAR 1 KB PLUS DNA LADDER (INVITROGEN, EUA), 1 CONTROL POSITIVO *B. abortus* ATCC 23448, 2 CONTROL POSITIVO *B. melitensis* ATCC 23456, 3 CONTROL NEGATIVO, 4-9 CEPAS AISLADAS DE QUESOS. AGAROSA 1,5%. TINCIÓN BROMURO DE ETIDIO (PROMEGA, EUA).**



**FIGURA 3. CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE PRODUCTOS DE PCR PARA LA IDENTIFICACIÓN DE *LISTERIA MONOCYTOGENES* IZQUIERDA: GEN *PRFA* Y DERECHA: GEN *HLYA*. M MARCADOR DE TALLA MOLECULAR 1 KB PLUS DNA LADDER (INVITROGEN, EUA), 1 CONTROL POSITIVO *L. Monocytogenes* ATCC 9525, 2 CONTROL NEGATIVO, 3 CEPA AISLADA DE QUESOS. AGAROSA 1,5%. TINCIÓN BROMURO DE ETIDIO (PROMEGA, EUA).**

*S. aureus* fue el microorganismo con mayor frecuencia de aislamiento. Diecinueve muestras fueron positivas para *S. aureus*, de las cuales, en nueve muestras se identificaron cepas productoras de enterotoxinas. La mayoría de ellas, el 44% fueron recolectadas directamente de queserías artesanales.

Es importante mencionar, que algunas muestras presentaron más de un patógeno. El queso que contenía *L. monocytogenes* que se recolectó en un supermercado presentó además aislamiento positivo para *Brucella*. Otro queso obtenido también de un supermercado presentó *Brucella*, y contenía cepas de *S. aureus* productoras de enterotoxinas. Por último, un queso positivo para *Salmonella*, recolectado de un almacén, presentó altos recuentos de *S. aureus*.

Basados en el hecho de que los quesos frescos son productos listos para el consumo, los cuales no reciben un tratamiento térmico para asegurar la eliminación de patógenos, se evaluó microbiológicamente la presencia de patógenos en quesos artesanales de una zona lechera en el Golfo de México (FIG. 1). Este trabajo se enfocó en la identificación de *Brucella*, debido a que es un patógeno endémico en México que además de generar pérdidas económicas en la ganadería también tiene un impacto en la salud pública. El aislamiento de *Brucella* en el diagnóstico de pacientes con brucelosis no es una práctica rutinaria, mucho menos lo es en los derivados lácteos que son el principal vehículo en la trasmisión de la brucelosis [25,29]. Además, se analizó la presencia de otros patógenos asociados a brotes en este tipo de alimento.

La presencia de los patógenos encontrados en el presente estudio fue similar a los reportados en otros países, específicamente en países de Latinoamérica, en donde el consumo de quesos frescos no pasteurizados también es frecuente en la población [24, 31, 37, 38].

Kousta y col. [22] señalaron la presencia de patógenos en contenedores de leche en donde se recolecta la leche en las lecherías, remarcando que la leche cruda es una fuente de contaminación de los quesos. En México, el Ministerio de Sanidad prohíbe tanto la producción como la venta de derivados lácteos no pasteurizados, a pesar de ello, los quesos no pasteurizados se siguen comercializando en todo el país.

Como se mencionó anteriormente, el aislamiento de *Brucella* a partir de alimentos o humanos enfermos en México no es una práctica rutinaria, sin embargo, existen algunos reportes donde han aislado el patógeno de productos lácteos [29]. En la última década, *Brucella* spp. provocó cinco brotes en Estados Unidos. En todos los casos clínicos, la causa se debió al consumo de quesos no pasteurizados [8]. También se ha reportado la entrada de quesos no pasteurizados a Estados Unidos o a Europa llevados por inmigrantes que han provocado casos humanos de brucelosis [4,25]. A pesar de que *Brucella* se considera un organismo fastidioso, que es difícil de aislar durante el primo-aislamiento, en este trabajo se detectaron 6 aislados identificados microbiológicamente como *B. abortus*, que fueron corroborados mediante la amplificación del gen *bcsf31*, específico del género. *B. abortus* causa principalmente brucelosis en vacas y genera en el humano brucelosis, por lo cual, es considerada una zoonosis [15]. Debido a su patogenicidad, ninguna de las especies de *Brucella* que generan enfermedad en animales domésticos debe estar presente en los quesos. Es importante remarcar, que tres quesos que tenían *Brucella* se compraron en supermercados en donde se esperaba que la calidad microbiológica estuviera garantizada. Estos resultados son importantes desde el punto de vista epidemiológico debido a que es una evidencia más de que los quesos son un riesgo para los consumidores, y apoyarán a las autoridades sanitarias para mejorar la producción y la vigilancia sanitaria de este alimento.

*L. monocytogenes* es un microorganismo capaz de crecer en un amplio intervalo de temperaturas (0 a 42°C), en valores de pH de 4 a 9 y a altas concentraciones de sal (>20%) [6]. *L. monocytogenes* se ha asociado a casi la mitad de los brotes transmitidos por el consumo de productos lácteos en Europa [22]. En Estados Unidos se han reportado brotes de listeriosis por el consumo de quesos estilo mexicano [20,26]. Sin embargo, en México se carece de un sistema de vigilancia epidemiológica que genere información precisa sobre la incidencia de listeriosis y su asociación con enfermedades provocadas por alimentos [6]. En este estudio se identificó solo una muestra positiva a *L. monocytogenes* (2%). Soto y col. [33] reportaron una prevalencia de 9,3% de *L. monocytogenes* en quesos originarios de Culiacán, una región al norte de México. Sin embargo, reportes de diferentes países han mostrado prevalencias mayores a las encontradas en este trabajo [11,30].

*Salmonella* es el patógeno más frecuentemente asociado a brotes alimentarios debido al consumo de quesos en los Estados Unidos [17]. Este patógeno puede sobrevivir a bajo pH y desarrollarse bien en derivados lácteos, en consecuencia continúa siendo una prioridad en la industria alimentaria [34]. En este trabajo, se identificaron dos cepas de *Salmonella* (4%), serogrupo E. Los serogrupos que causan aproximadamente el 99% de las infecciones en humanos y animales de sangre caliente son los serogrupos A, B, C1, C2, D y E [5]. La ausencia o baja prevalencia de *Salmonella* en quesos se ha reportado en varios países [12, 23]. Soto y col. [33] no encontraron muestras positivas a *Salmonella* en 75 quesos analizados en el norte de México. En contraste, Torres-Vitela y col. [35] reportaron una prevalencia de 34% de *Salmonella* en quesos frescos del centro de México. Las diferencias en las condiciones climáticas en los diferentes lugares donde se producen los quesos parecen impactar en la calidad microbiológica de los mismos. En Tabasco, la temperatura promedio anual es de 27°C durante el día y se observó que los quesos no se mantenían en refrigeración, la mayoría de los productos se encontraban a temperatura ambiente. La falta de condiciones de refrigeración de los quesos, permite que los patógenos así como la biota asociada como bacterias lácticas se multipliquen. Tales condiciones probablemente influyeron negativamente en el aislamiento de patógenos, como fue el caso de *Salmonella* y *Listeria*, que probablemente fueron inhibidas o enmascaradas por el crecimiento masivo de otros organismos.

Los resultados de este trabajo mostraron que el 36% de los quesos contenían *S. aureus*. En algunas muestras, la concentración de este microorganismo estuvo por encima de  $1,7 \times 10^7$  CFU/g. Estos hallazgos podrían estar relacionados con deficientes condiciones sanitarias durante la producción de los quesos. Es importante mencionar, que las personas que producen los quesos son pequeños productores que preparan estos productos sin instalaciones y equipos adecuados, y sin preparación profesional para realizar buenas prácticas de manufactura. Los quesos se preparan de forma artesanal, con utensilios de madera o plástico.

La intoxicación por *S. aureus* es una de las enfermedades transmitidas por alimentos más común, que resulta de la ingesta de enterotoxinas producidas por cepas de *S. aureus* enterotoxigénicas. Torres-Vitela y col. [35] evaluaron la incidencia de patógenos en quesos frescos del estado de Jalisco, una región central de México. En su trabajo no encontraron *Staphylococcus* productores de enterotoxinas en 200 quesos analizados. Sin embargo, en el presente trabajo se detectaron nueve muestras positivas a cepas enterotoxigénicas. Del 2006 al 2008, las autoridades relacionadas con la seguridad alimentaria Europea reportaron, que las enterotoxinas de *Staphylococcus* generaron el 5% de los brotes causados por alimentos, sin embargo, este porcentaje se considera que está por debajo de los datos reales debido al uso de una deficiente o inadecuada metodología para la detección de las enterotoxinas [18]. Las medidas de prevención para evitar la contaminación con *Staphylococcus*

enterotoxigénicos se basan en aplicar medidas de higiene como limpieza y desinfección de materiales y equipos, manejo adecuado del producto, así como mantener el producto terminado libre de fauna nociva y a temperatura de refrigeración [18]. En el caso de las muestras recolectadas es probable que al no estar refrigeradas y mantenerse a una temperatura de 27°C generó la multiplicación de los *Staphylococcus* alcanzando dosis infectiva. Al mismo tiempo, es importante mencionar que esta temperatura podría permitir el crecimiento de otros patógenos, por lo que no es sorprendente encontrar más de un patógeno en una misma muestra como se reportó en este trabajo.

## CONCLUSIONES

Se demostró la presencia de *B. abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos, en quesos frescos, los cuales representan un riesgo potencial para los consumidores. El conocimiento sobre el origen y fuentes de contaminación, el uso de leche pasteurizada así como la implementación de buenas prácticas higiénicas en la elaboración de derivados lácteos son herramientas necesarias para mejorar la calidad microbiológica de estos productos.

## AGRADECIMIENTO

Fuentes de financiamiento: CONACYT 367902, SIP-20151815, and SIP-20161292. RLGH y AIME fueron apoyados por CONACYT y PIFI-IPN. ALM y ACR recibieron becas COFAA-IPN, SIP-EDI, y SNI-CONACYT.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALTON, G.G.; JONES, L.M.; PIET, D.E. Bacteriological methods. In: **Laboratory Techniques in Brucellosis**. 2nd Ed. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris Pp 33-57. 1975.
- [2] AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; OMICCIOLI, E.; CASIERE, A.; BRUCE, I.; MAGNANI, M. Direct detection of *Listeria monocytogenes* from milk by magnetic based DNA isolation and PCR. **Food Microbiol.** 21:597-603. 2004.
- [3] BAILY, G.; KRAHN, J.; DRASAR, B.; STOKER, N. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. **J. Trop. Med. Hyg.** 95: 271-275. 1992.
- [4] BEUTLICH, J.; HAMMERL, J.; APPEL, B.; NOCKLER, K.; HELMUTH, R.; JOST, K.; LUDWIG, MR.; HANKE, C.; BECHTOLD, D.; MAYER-SCHOLL, A. Characterization of illegal food items and identification of foodborne pathogens brought into the European Union via two major German airports. **Int. J. Food Microbiol.** 209: 13-19. 2015.
- [5] BRENNER, F.W.; VILLAR, R.G.; ANGULO, F.J.; TAUXE, R.; SWAMINATHAN, B. *Salmonella* Nomenclature. **J. Clin. Microbiol.** 38: 2465-2467. 2000.
- [6] CASTAÑEDA-RUELAS, G.; ESLAVA-CAMPOS, C.; CASTRO DEL CAMPO, N.; LEÓN-FÉLIX, J.; CHAIDEZ-QUIROZ, C. Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. **Sal. Publ. Méx.** 56: 654-659. 2014.
- [7] CASTRO, V.; DÍAZ, A.M.; TORRES, B. Análisis de la calidad sanitaria de las queserías y los quesos en el Estado del Tabasco en el periodo 2002-2005. **Sal. Tabasco** 13: 560-567. 2007.
- [8] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Food Outbreak Online Database. 2011. On Line: <http://wwwn.cdc.gov/foodborneoutbreaks>. 11/04/2016.
- [9] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Surveillance for foodborne disease outbreaks-United State, 2012: Annual Report. 2012. On Line: <http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2012-508c.pdf>. 11/04/2016.
- [10] CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Surveillance for foodborne disease outbreaks-United State, 2013: Annual Report. 2013. On Line: <http://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf>. 11/04/2016.
- [11] CHAMBEL, L.; SOL, M.; FERNANDES, I.; BARBOSA, M.; ZILHÃO, I.; BARATA, B.; JORDAN, S.; PERNI, S.; SHAMA, G.; ADRIAO, A.; FALEIRO, L.; REQUENA, T.; PALAEZ, C.; ANDREW, P.W.; TENREIRO, R. Occurrence and persistence of *Listeria* spp. in the environment of ewe and cow's milk cheese dairies in Portugal unveiled by an integrated analysis of identification, typing and spatial-temporal mapping along production cycle. **Int. J. Food Microbiol.** 116: 52-63. 2007.
- [12] COLAK, H.; HAMPIKYAN, H.; BINGOL, E.; ULUSOY, B. Prevalence of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. in Tulum cheese. **Food Contr.** 18: 576-9. 2005.
- [13] DOMINGUEZ, M.; JOURDAN-DA SILVA, N.; VAILLANT, V.; PIHIER, N.; KERMIN, C.; WEILL, F.X.; DELMAS, G.; KEROUANTON, A.; BRISABOIS, A.; DE VALK, H. Outbreak of *Salmonella* enterica serotype Montevideo infections in France linked to consumption of cheese made from raw milk. **Foodborne Pathog. Dis.** 6: 121-128. 2009.
- [14] GERMINI, A.; MASOLA, A.; CARNEVALI, P.; MARCHELLI, R. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. **Food Contr.** 20: 733-738. 2009.
- [15] GODFROID, J.; CLOECKAERT, A.; LIAUTARD, J.P.; KOHLER, S.; FRETIN, D.; WALRAVENS, K.; GARIN-BASTUJI, B.; LETESSON, J.J. From the discovery of the Malta fever's agent to the discovery of a marine mammal reservoir, brucellosis has continuously been a re-emerging zoonosis. **Vet. Res.** 36: 313-326. 2005.

- [16] GONZALEZ-CORDOVA, A.F.; YESCAS, C.; ORTIZ-ESTRADA, A.M.; ROSA-ALCARAZ, M.A.D.; HERNANDEZ-MENDOZA, A.; VALLEJO-CORDOBA, B. Invited review: Artisanal Mexican cheeses. **J. Dairy Sci.** 99: 3250-3262. 2016.
- [17] GOULD, L.; MUNGAI, E.; BEHRAVESH, C. Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998–2011. **Foodborne Pathog. Dis.** 11: 545-551. 2014.
- [18] HENNEKINNE, J.; DE BUYSER, M.; DRAGACCI, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiol. Rev.** 36: 815-836. 2012.
- [19] INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA (INEGI). Anuario estadístico y geográfico de Tabasco. 2015. En línea: [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva\\_estruc/anuarios\\_2015/702825077167.pdf](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/anuarios_2015/702825077167.pdf). 14/07/2016.
- [20] JACKSON, K.A.; BIGGERSTAFF, M.; TOBIN-D'ANGELO, M.; SWEAT, D.; KLOS, R.; NOSARI, J.; GARRISON, O.; BOOTHE, E.; SAATHOFF-HUBER, L.; HAINSTOCK, L.; FAGAN, R.P. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* associated with Mexican-style cheese made from pasteurized milk among pregnant, Hispanic women. **J. Food Prot.** 74: 949-953. 2011.
- [21] JIMÉNEZ-GUZMÁN, J.; FLORES-NÁJERA, A.; CRUZ-GUERRERO, A.; GARCÍA-GARIBAY, M. Use of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* in the manufacture of Mexican Panela cheese. **Food Sci. Technol.** 42: 1508-1512. 2009.
- [22] KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E.H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Contr.** 21: 805-815. 2010.
- [23] LITTLE, C.L.; RHOADES, J.R.; SAGOO, S.K.; HARRIS, J.; GREENWOOD, M.; MITHANI, V.; GRANT, K.; MCLAUCHLIN, J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. **Food Microbiol.** 25: 304-312. 2008.
- [24] LUJAN, D.; VALENTIN, M.; MOLINA, M. Evaluación de la presencia de *Staphylococcus aureus* en quesos frescos artesanales en tres distritos de Lima–Perú. 2006. Revista de Salud Pública y Nutrición. 2006. En Línea: [http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/articulos/quesos\\_frescos-1.htm](http://www.respyn.uanl.mx/vii/2/articulos/quesos_frescos-1.htm). 11-04-16.
- [25] LUSK, T.S.; STRAIN, E.; KASE, J.A. Comparison of six commercial DNA extraction kits for detection of *Brucella neotomae* in Mexican and Central American-style cheese and other milk products. **Food Microbiol.** 34:100-105. 2013.
- [26] MACDONALD, P.; WHITWAM, R.; BOGGS, J.; MACCORMACK, J.; ANDERSON, K.; REARDON, J.; SAAH, J.R.; GRAVES, L.M.; HUNTER, S.B.; SOBEL, J. Outbreak of listeriosis among Mexican immigrants as a result of consumption of illicitly produced Mexican-style cheese. **Clin. Infect. Dis.** 40: 677-682. 2005.
- [27] MÉNDEZ-MARTÍNEZ, C.; PÁEZ-JIMÉNEZ, A.; CORTÉS-BLANCO, M.; SALMORAL-CHAMIZO, E.; MOHEDANO-MOHEDANO, E.; PLATA, C.; VARO-BAENA, A.; MARTINEZ-NAVARRO, F. Brucellosis outbreak due to unpasteurized raw goat cheese in Andalucía (Spain), January – March 2002. **Eurosurveill.** 8: 164-168. 2003.
- [28] MORALES-ESTRADA, A.; CASTILLO-SALTO, J.; LÓPEZ-MERINO, A.; MORALES-GARCÍA, M.; VALLE-VALDEZ, J.; CONTRERAS-RODRÍGUEZ, A. Characterization of *Brucella* species in Mexico by Bruce-Ladder polymerase chain reaction (PCR). **Afr. J. Microbiol. Res.** 6: 2793-2796. 2012.
- [29] MORALES-GARCÍA, M.R.; LÓPEZ-MÉNDEZ, J.; PLESS, R.; GARCÍA-MORALES, E.; KOSANKE, H.; HERNÁNDEZ-CASTRO, R.; BEDI, J.; LOPEZ-MERINO, A.; VELAZQUEZ-GUADARRAMA, N.; JIMENEZ-ROJAS, L.; CONTRERAS-RODRIGUEZ, A. Brucellosis outbreaks in a rural endemic region of Mexico - a comprehensive investigation. **Vet. Ital.** 51: 185-190. 2015.
- [30] PINTADO, C.; OLIVEIRA, A.; PAMPULHA, M.; FERREIRA, M. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. **Food Microbiol.** 22: 79-85. 2005.
- [31] ROMERO-CASTILLO, P.A.; LEYVA-RUELAS, G.; CRUZ-CASTILLO, J.G.; SANTOS-MORENO, A. Evaluación de la calidad sanitaria de quesos crema tropical mexicano de la región de Tonalá, Chiapas. **Rev. Mex. Ing. Quim.** 8: 111-119. 2009.
- [32] SAXER, S.; MIESCHER, S.; LACROIX, C. Characterization of the microflora of industrial Mexican cheeses produced without added chemical preservatives. **LWT Food Sci. Technol.** 53: 314-320. 2013.
- [33] SOTO-BELTRAN, M.; GERBA, C.P.; PORTO-FETT, A.; LUCHANSKY, J.B.; CHAIDEZ, C. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from small Mexican retail markets of queso fresco. **Int. J. Environ. Heal. R.** 25:140-148. 2015.
- [34] TAMAGNINI, L.; DE SOUSA, G.; GONZALEZ, R.; REVELLI, R.; BUDDE, C. Behavior of *Yersinia enterocolitica* and *Salmonella typhimurium* in Crottin goat's cheese. **Int. J. Food Microbiol.** 99:129-134. 2005.

- [35] TORRES-VITELA, M.; MENDOZA-BERNARDO, M.; CASTRO-ROSA, J.; GÓMEZ-ALDAPA, C.; GARAY-MARTÍNEZ, L.; NAVARRO-HIDALGO, V.; VILLARRUEL-LOPEZ, A. Incidence of *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and Staphylococcal Enterotoxin in two types of mexican fresh cheeses. **J. Food Prot.** 75: 79-84. 2012.
- [36] VALDIVIA-TAPIA, M.C.; PINELO-CHUMBE, E.; CARREAZO, N.Y. Meningitis por *Listeria monocytogenes* en niñas inmunocompetentes: queso no pasteurizado como probable causa de infección. **Rev. Chil. Infectol.** 32: 464-466. 2015.
- [37] VANEGAS, L.; GONZÁLEZ, G.; MARTÍNEZ, L.; BUITRAGO, F. Aislamiento y caracterización de cepas de *Staphylococcus* enterotoxigénicos aislados de quesos en Bogotá. **Rev. MVZ Córdoba** 13: 1288-1293. 2008.
- [38] VILLALOBOS DE B, L.; MARTÍNEZ, R. Aislamiento e identificación por métodos convencionales y PCR de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos frescos comercializados en Cumana, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XVII (17): 529-536. 2007.