

Detección de *Salmonella* spp y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimadurados que se expenden en vía pública en la ciudad de México

Detection of *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes* in fresh and semi-cured cheeses that are sold on the street markets in Mexico City

Claudia D. Alcázar Montañez* María Salud Rubio Lozano** Fernando Núñez Espinosa*
Rogelio A. Alonso Morales***

Abstract

The objective of this study was to determine the bacteriological safety of fresh and semi-cured cheeses that are sold on the street markets in Mexico City. The polymerase chain reaction (PCR) was used to simultaneously detect *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes*. Also, traditional microbiological methods were used to determine *Salmonella* spp (NOM-114-SSA1-1994) and *L. monocytogenes* (NOM-143-SSA1-1995) in food. A total of 120 sample, randomly taken from four street markets of the south of the city, were analyzed. The methodology for multiplex PCR was based on the simultaneous amplification of *InvA* and *lap* genes from *Salmonella* spp and *L. monocytogenes* respectively. Bacterial DNA extraction from cheese samples was developed in order to eliminate or diminish the possible interference of inhibitors of food using previous centrifugation of the samples and it was checked that the amplification of both resulted positive, even when the pathogens are present in the samples at a concentration of, at least, 30 UFC/g. PCR results indicated that only 3 samples were positive to *Salmonella* spp and none to *L. monocytogenes* compared to the bacteriological method results which showed no positive results..

Key words: CHEESES, STREET VENDERS, *SALMONELLA* SPP, *L. MONOCYTOGENES*, BACTERIOLOGICAL, PCR.

Resumen

Con el objetivo de determinar la inocuidad bacteriológica de los quesos frescos y semimadurados que se venden en algunos "mercados sobre ruedas" en la ciudad de México, se realizó la detección simultánea de *Salmonella* spp y de *Listeria monocytogenes*, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), así como con los métodos bacteriológicos convencionales, según la normatividad correspondiente para cada microorganismo; es decir, la NOM-114-SSA1-1994 mexicana, que constituye un método para la determinación de *Salmonella* en alimentos; de igual manera la NOM-143-SSA1-1995 mexicana, que representa un método de prueba microbiológica para alimentos y determinación de *L. monocytogenes*. Se analizaron 120 muestras seleccionadas al azar, provenientes de cuatro "mercados sobre ruedas" de una zona del sur de la ciudad de México. La metodología propuesta para la PCR múltiple se basó en la amplificación simultánea de los genes *InvA* e *lap* procedentes de los genomas de *Salmonella* spp y de *L. monocytogenes*, respectivamente; de igual forma, la metodología para la extracción de ADN bacteriano a partir de las muestras se desarrolló con el fin de eliminar o disminuir la posible interferencia de inhibidores propios del alimento mediante centrifugación previa de las muestras y se comprobó que la amplificación de ambos resultó positiva, aun cuando los patógenos se encuentren presentes en las muestras a una concentración de por lo menos 30 UFC/g. Del total de muestras analizadas con la técnica de PCR, sólo tres resultaron positivas a la presencia de *Salmonella* spp, en ninguna estuvo presente *L. monocytogenes*, en contraste con los resultados de los métodos bacteriológicos, por medio de los cuales no se obtuvo ningún resultado positivo.

Palabras clave: QUESOS, VÍA PÚBLICA, *SALMONELLA* SPP, *L. MONOCYTOGENES*, BACTERIOLÓGICO, PCR

Recibido el 19 de octubre de 2005 y aceptado el 26 de abril de 2006.

*Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

**Laboratorio de Ciencia de la Carne, Centro de Enseñanza Práctica, Investigación en Producción y Sanidad Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cruz Blanca 241, San Miguel Topilejo, 14500, México, D. F.

***Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Genética y Mejoramiento Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Autor responsable: José Fernando Núñez Espinosa, Departamento de Medicina Preventiva, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., Tel. (5255) 5622-5858, Fax (5255) 5622-5859, nuezfernando@aol.com. Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de México y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM.

Introduction

The diseases transmitted by food (DTF) are one of the main problems of worldwide health and important cause of reduction on economical growth; nevertheless, in the majority of cases the origin is unknown.¹ In Mexico, as in other developing countries, at par with the State economy, an informal economy exists, of which one of their activities is the sale of food in streets. This way of offering food to the consumer is a great risk for health, because the conditions in which they are sold are not appropriate, for it favors its microbiological contamination.^{2,3} For this reason, it is particularly important to try to determine the impact these foods, sold on the streets, has in the presence of these diseases.

The more involved perishable foods and the ones which require a lot of manipulation are the milk and meat products.

Up to the 2000's, more than 200 cases of food intoxication were registered only in one African country, where the involved foods were milk products sold on the street.^{4,5} The microbiological quality of the food sold on the street has been investigated in different cities and countries, in order to demonstrate the epidemiological risk that they represent.

It must be mentioned that in Mexico there are no case notification records of gastrointestinal diseases and its relation with food that is sold on the streets. Some of the pathogen agents that are more commonly detected in this type of food are *B. serus*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp, in which *Salmonella* has frequently resulted;² likewise, the count of coliform organisms have been elevated, due to simultaneous sanitary problems in the preparation and sale of food, as the incorrect handling and keeping of these products at room temperature during prolonged periods of time. The results of the sanitary surveillance of these foods shows the existence of microbiological contamination that must be prevented by means of more efficient actions to guarantee the consumers' health.^{2,5}

In Mexico and other Latin-American countries, a common way of selling food on the streets is on street markets, where the products are exposed on movable stands for its sale, in certain days of the week.

Of the analyzed cheeses, the Panela type is fresh, soft paste, auto-pressed and elaborated with pasteurized cow milk. Its composition includes a high percentage of humidity (up to 58%) and because of this, it is highly perishable; therefore, it should be in refrigeration until consumed. Although its pH is relatively low, due to the low salt concentration, that parameter has no great inhibitory effect on harmful microorganisms.

Introducción

Las enfermedades transmitidas mediante alimentos (ETA) son uno de los principales problemas de salud internacional y causa importante de reducción en el crecimiento económico; sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce el origen.¹ En México, como en otros países en desarrollo, a la par con la economía del Estado existe una economía informal, entre cuyas actividades se encuentra la venta de alimentos en la vía pública. Esta forma de ofrecer los alimentos a los consumidores puede ser de alto riesgo sanitario, ya que las condiciones en que se expenden dichos productos no son apropiadas, porque favorecen la contaminación microbiológica.^{2,3} Por esta razón, resulta de particular importancia tratar de determinar el impacto que la venta de alimentos en la vía pública tiene en la presentación de estas enfermedades.

Los alimentos perecederos y los que requieren mucha manipulación, son los más frecuentemente involucrados, entre ellos destacan los productos lácteos y cárnicos. Hasta 2000 se registraron más de 200 casos de intoxicación alimentaria tan sólo en un país africano, donde los alimentos involucrados fueron productos lácteos vendidos en la calle.^{4,5} La calidad microbiológica de los alimentos que se venden en las calles se ha investigado en diferentes ciudades y países para demostrar el riesgo epidemiológico que representan.

En México no existen registros en cuanto a la notificación de casos de enfermedades gastrointestinales y su relación con el consumo de alimentos que se expenden en la vía pública. Algunos de los agentes patógenos más comunes en los alimentos que se venden en vía pública son *B. cereus*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp, en los que la detección de *Salmonella* es frecuente;² asimismo, las cuentas de organismos coliformes han sido elevadas, debido a coincidentes problemas sanitarios en la preparación y venta de alimentos, como la manipulación incorrecta y el mantenimiento de este tipo de productos a temperatura ambiente durante un tiempo prolongado. Los resultados de la vigilancia sanitaria de estos alimentos demuestran la existencia de contaminaciones microbiológicas que deben prevenirse mediante acciones más eficientes para garantizar la salud de los consumidores.^{2,5}

En México y en otros países latinoamericanos, una forma de venta de alimentos en vía pública se realiza en mercados sobre ruedas o tianguis, donde los productos se exponen sobre puestos removibles para su venta, sólo en determinados días de la semana.

De los quesos analizados, el panela es un tipo de queso fresco, de pasta blanda, autoprensado, elabo-

The Chihuahua type cheese is elaborated with whole cow milk with a minimum grease content of 3%, standardized, pasteurized and with lactic ferments added like *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. Its elaboration requires the use of pasteurized milk, lactic ferments, additives like calcium chloride and potassium nitrate, pressed and aged. Like the Panela type cheese, it is essential the use of refrigerator temperatures for its conservation, this condition is not fulfilled when these products are exposed for their sale on the streets.⁶

The aim of this research was to determine the presence or absence of *Salmonella* spp and *L. monocytogenes*, as contaminants in fresh and semi-cured cheeses, commercialized on street markets in the city of Mexico, through microbiological analyses and the use of the polymerase chain reaction (PCR) as confirmatory test.

Materials and methods

Bacteriological analysis

Samples

A non-probabilistic sampling was used by convenience, which was chosen in function of the heterogeneity of the selection,⁷ conformed by 120 samples of Panela and Chihuahua type cheeses, from different processing plants, packed by the bulk and commercialized on the street. The samples were purchased from four different street markets in Mexico City: 30 samples from each market. In the first and second markets ("A" and "B") Panela type cheese samples were bought, in the third ("C") and fourth ("D") markets, Chihuahua type cheese samples were bought. The samples were obtained in each market, in different dates and hours.

The cheeses from where the analytic samples were taken were in similar conditions of temperature and handling, placed over tables, behind a glass display cabinet and protected by plastic wrapping. The procedures for the sampling and handling of food samples and for preparation and dilution, were the ones recommended by the Department of Health.⁸

Bacteriological culture technique

The detection of *Salmonella* spp was done according to the NOM-114-SSA1-19949 and the determination of *L. monocytogenes* in food was done according to NOM-143-SSA1-1995.¹⁰ Twenty five g from each sample were taken in sterile conditions, placed in 225 mL of peptoned water, and incubated for 24 h at 35°C; 1mL of the homogenized liquid was taken and deposited

rado con leche pasteurizada de vaca. Su composición incluye un porcentaje alto de humedad (hasta 58%), por ello es altamente perecedero, de ahí que deba conservarse en refrigeración hasta el momento de ser consumido. No obstante, su pH es bajo, debido a la baja concentración de sal, ese parámetro no ejerce un efecto inhibitorio en los microorganismos dañinos.

El queso tipo Chihuahua es elaborado con leche entera de vaca con contenido mínimo de grasa de 3%, estandarizada, pasteurizada y adicionada de fermentos lácticos como *Streptococcus lactis* y *Streptococcus cremoris*. Su elaboración requiere el empleo de leche pasteurizada, manejo de cultivos lácticos, aditivos como cloruro de calcio y nitrato de potasio, prensado y madurado del producto. Igual que para el queso tipo panela, es indispensable el empleo de temperaturas de refrigeración para preservarlo, esa condición no se cumple cuando estos productos son expuestos para su venta en los mercados sobre ruedas.⁶

El objetivo de este estudio fue determinar la presencia o ausencia de *Salmonella* spp y *L. monocytogenes*, como agentes contaminantes en quesos frescos y semimadurados, comercializados en mercados sobre ruedas en la ciudad de México, a través de análisis microbiológicos y el empleo de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como prueba confirmatoria.

Material y métodos

Análisis bacteriológicos

Muestras

Se empleó un muestreo no probabilístico por conveniencia, que fue seleccionado en función de la heterogeneidad de la selección,⁷ conformada por un total de 120 muestras de quesos tipo panela y tipo Chihuahua, de diferentes plantas procesadoras, empaçados a granel y comercializados en la vía pública. Las muestras se adquirieron en cuatro mercados sobre ruedas (30 muestras de cada mercado) de una zona del sur de la ciudad de México: En el primero y segundo mercados ("A" y "B") se obtuvieron muestras de queso tipo panela, en el tercero ("C") y cuarto mercados ("D"), se adquirieron quesos tipo Chihuahua. Las muestras se obtuvieron en diferentes fechas y horarios.

Los quesos de los que se obtuvieron las muestras analíticas se encontraron en condiciones similares de temperatura y manipulación, colocados sobre las mesas, tras una vitrina de vidrio y protegidos por empaques de plástico. Los procedimientos para la toma y manejo de muestras de alimentos y para su preparación y dilución son recomendación de la Secretaría de Salud del gobierno federal.⁸

in a tube with 9 mL of tetrathionate broth; another mL for 9 mL of selenite-cystine broth, and 1 mL more for 9 mL as enriched broth for *L. monocytogenes* (LEB); the three tubes were incubated for 24 h at $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Later on, for the detection of *Salmonella* spp, these were cultivated in Hektoen and xylose-lysine deoxycholate (XLD) selective agar mediums, in the tube with tetrathionate broth and selenite-cystine. After incubation in these mediums, the suspicious samples were subjected to the biochemical tests in the lysine-iron agar (LIA) and triple sugar-iron (TSI). After the biochemical identification, the serological analysis was performed for the determination of *Salmonella* spp's genus by polyvalent serum of somatic antigen.⁹ It was also cultivated in Palcam agar, from the tubes with LEB for the identification of *L. monocytogenes*, incubating at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ and $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h, respectively. Later on it was proceeded to identify them by biochemical tests, which include fermentation of carbohydrates in phenol red as indicator; mannitol, mannose, ramnose and maltose, that, according to the correspondent norm, they must all generate fermentation with the exception of mannitol.¹⁰

Analysis by PCR

Selected oligo-nucleotides

Indicators were used for the amplification of gene *InvA* of *Salmonella* spp and *lap* gene of *L. monocytogenes*, obtained from the data base of GenBank from the National Center for Biotechnology Information,* these were tested together in a combined or multiple PCR, with the possibility to detect the DNA of some or both microorganisms from a unique reaction of PCR.

In the *Salmonella*'s genus a specific region of the DNA which belongs to gene *InvA* has been identified, which confers the capacity to invade epithelial cells of the guests.^{11,12} The used initiators for the amplification of gene *InvA* generate a product of amplification of 283 pb and have the sequences: *InvA*-1 5'-CAGTggTgTCATATCATTgCC-3' and *InvA*-2 5'-gTAAGAAg-gTgCTTATACATCTgC-3'.¹¹

In this context, the gene *lap* permits to differentiate *L. monocytogenes* from *L. innocua*, *L. grayi*, *L. ivanovi*, *L. seeligeri* and *L. murrayi*.^{13,14} This gene codifies for the formation of the surface protein p60, that actuates as a murine hydrolase, involved in cellular division, favoring the survival and adaptation of the bacterial cell.¹⁵

For its amplification, a pair of initiators, designated as Mar-1 and Mar-2 whose sequences are: 5'-gggCTT-TATCCATAAAATA-3' and 5'-TTggAAgAACCTT-gATTA-3', respectively, and generate and amplified product of 453 pb ere used.¹⁶

Técnica de cultivo bacteriológico

La detección de *Salmonella* spp se realizó conforme lo señala la NOM-114-SSA1-1994⁹ mexicana y la determinación de *L. monocytogenes* en alimentos, se realizó de acuerdo con la NOM-143-SSA1-1995 mexicana.¹⁰ Se tomaron 25 g de cada muestra en condiciones de esterilidad, se depositaron en 225 mL de agua peptonada y se incubó durante 24 h a 35°C ; se tomó 1 mL del líquido homogeneizado y se depositó en un tubo con 9 mL de caldo tetratratonato; otro mililitro para 9 mL de caldo selenito-cistina, y 1 mL para 9 mL de caldo de enriquecimiento para *L. monocytogenes* (LEB); los tres tubos se incubaron por 24 h a $35 \pm 1^\circ\text{C}$. Posteriormente, para la detección de *Salmonella* spp, se sembraron en los agares selectivos Hektoen y xilosa-lisina desoxicolato (XLD), tanto de los tubos con caldo tetratratonato, como de selenito-cistina. Después de la incubación en estos medios, las muestras sospechosas se sometieron a pruebas bioquímicas en los agares lisina-hierro (LIA) y triple azúcar-hierro (TSI). Tras la identificación bioquímica se realizó el análisis serológico para la determinación del género *Salmonella* spp mediante suero polivalente de antígeno somático.⁹ También se sembró en agar Palcam, a partir de los tubos con caldo LEB para la identificación de *L. monocytogenes*, incubando a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ y $25 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 h, respectivamente. Transcurrido ese periodo, se procedió a la identificación por medio de pruebas bioquímicas, éstas incluyen fermentación de carbohidratos en rojo de fenol como indicador: manitol, manosa, ramnosa y maltosa, que, de acuerdo con la norma correspondiente, deben generar fermentación en todos ellos con excepción del manitol.¹⁰

Análisis por PCR

Oligonucleótidos seleccionados

Se utilizaron iniciadores para la amplificación del gen *InvA* de *Salmonella* spp y el gen *Iap* de *L. monocytogenes*, obtenidos de la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information,* éstos fueron ensayados juntos en una PCR combinada o múltiple, con la posibilidad de detectar el ADN de alguno o de ambos microorganismos a partir de una reacción única de PCR.

En el género *Salmonella* se ha identificado una región específica del ADN que pertenece al gen *InvA*, el cual le confiere la habilidad de invadir a las células epiteliales de los portadores.^{11,12} Los iniciadores empleados para la amplificación del gen *InvA* generan un producto de amplificación de 283 pb y poseen las

*<http://www.psc.edu/general/software/packages/genbank/genbank.html>

Specificity of the initiators

To determine its specificity, the initiators for the amplification of genes *InvA* and *lap*, were tested in other studies with DNA derived from different bacterial genres and species.^{11,18}

In order to discard unspecific amplifications, different assays of PCR were done in this study for which DNA of *E. coli*, *Streptococcus cremoris* and *Staphylococcus aureus* was used, and were selected because they are some of the ones that form the most identified contaminated microflora in cheese.

Finally, the initiators for gene *InvA* of *Salmonella* sp, were tested with *L. monocytogenes* and vice versa.

PCR technique

To determine the conditions for the multiple PCR, as well as the specificity of the selected initiators, purified DNA from bacterial cultures was used, with this purpose the method of extraction of Silhavy *et al.*¹⁷ was used.

To perform the reaction, 0.4 µL of the selected initiators at a concentration of 0.2 µM per reaction; a buffer solution constituted by 1.5 µL of triton X-100 pH8 at 0.15%, 1 µL of bovine serum albumin (BSA) at 0.15 mg/mL; 2 µL of Cl₂Mg 1x; 2 µL of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP were used, respectively, at a concentration 0.2 µM y 0.4 µL at concentration of 2 u of DNA Taq polymerase, in sterile bi-distilled water as vehicle.¹⁸⁻¹⁹ Positive controls were used that included 25ng of purified DNA of each microorganism, testing on previous assays where their amplification was verified, as well as an internal control in the reaction, product of the DNA's amplification coming from the plasmid pBlueScript KS, of 100 pb, which sequences of initiators called BS759-1 and BS759-2 are: 5'-gTAC-CgggCCCC CCCTCg Ag-3' and 5'-ACCGCggTggCg-gCCgCTCT-3'. The resultant products of PCR were observed on agarose gels at 2.5%.¹⁷ The conditions for the simultaneous amplification were: 94°C for the denaturalization, 53°C for the alignment and 72°C for the extension.

Amplification's capacity of bacterial DNA in inoculated samples

To determine the speed and capacity of multiple PCR's amplification from bacterial DNA present in the samples, it was decided to utilize a bacterial concentration of 30 UFC/mL. Ten inoculated samples were used, and the specific methodology was developed for the obtainment of bacterial DNA coming from them. From these last, five were from Panela and five from Chihuahua type cheeses.

siguientes secuencias: *InvA*-1 5'-CAGTggTgTCATAT-CATTgCC-3' e *InvA*-2 5'-gTAAgAAggTgCTTATACA-TCTgC-3'.¹¹

Asimismo, el gen *Iap* permite diferenciar *L. monocytogenes* de *L. innocua*, *L. grayi*, *L. ivanocii*, *L. seeligeri* y *L. murrayi*.^{13,14} Este gen codifica para la formación de la proteína de superficie p60, que actúa como una hidrolasa murina, involucrada en la división celular, favoreciendo la adaptación y supervivencia de la célula bacteriana.¹⁵

Para su amplificación se empleó el siguiente par de iniciadores, designados como Mar-1 y Mar-2 cuyas secuencias son: 5'-gggCTTTATCCATAAAATA-3' y 5'-TTggAagAACCTTgATTA-3', respectivamente, y generan un producto de amplificación de 453 pb.¹⁶

Especificidad de los iniciadores

Para determinar su especificidad, los iniciadores para la amplificación de los genes *InvA* e *Iap*, fueron probados, en otros estudios, con ADN provenientes de diferentes géneros y especies bacterianas.^{11,16}

Con el fin de descartar amplificaciones inespecíficas, en este estudio se realizaron diferentes ensayos de PCR para los cuales se empleó ADN de *E. coli*, *Streptococcus cremoris* y *Staphylococcus aureus*, que se seleccionaron debido a que son algunos de los que forman parte de la microflora contaminante más frecuentemente identificada en el queso.

Finalmente, los iniciadores para el gen *InvA* de *Salmonella* sp, se probaron con ADN de *L. monocytogenes* y viceversa.

Técnica de PCR

A fin de determinar las condiciones para la PCR múltiple, así como la especificidad de los iniciadores seleccionados, se empleó ADN purificado de cultivos bacterianos, con ese propósito se utilizó el método de extracción de Silhavy *et al.*¹⁷

Para llevar a cabo la reacción se utilizó una solución amortiguadora constituida por 1.5 µL de tritón X-100 pH 8 al 0.15%, 1 µL de albúmina sérica bovina (BSA) a 0.15 mg/mL; 2 µL de Cl₂Mg 1x; 2 µL de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, respectivamente, a concentración de 2 u de ADN Taq polimerasa, en agua bidestilada estéril como vehículo.^{18,19} Se utilizaron testigos positivos que incluyeron en las reacciones 25 ng de ADN purificado de cada microorganismo, probado en ensayos previos en los que se verificó su amplificación, así como un testigo interno en la reacción, producto de la amplificación de ADN proveniente del plásmido pBlueScript KS, de 100 pb, cuyas secuencias de iniciadores denominados BS759-1 y BS759-2 son: 5'-gTACCGggCCCC CCCTCg Ag-3' y 5'-ACCGCggTggCggCCgCTCT-3'.

The following modifications were done to the protocol of DNA's extraction of pure bacterial cultures,¹⁸ 10 mL of the homogenized solution were taken for the obtainment of bacterial DNA, it was centrifuged at 1 200 *g* for 5 min in order to precipitate food particles; the supernatant was recovered, it was centrifuged at 4 600 *g* for 10 min at 4°C, for the obtainment of a tablet of the inoculated bacteria, this was re-suspended in lysis solution (8% sacarose, 5% triton X – 100, 50mM EDTA, 50 mM tris-HCl pH 8) and the time of exposition was increased from 10 to 20 min. Lysozyme at 1.5 µg/mL was utilized, incubated at room temperature for 30 min, and double boiled for 1 min to deactivate it; RNase was added at 15 µg/mL and incubated for 1 h at 37°C; proteinase K was used at 10 µg/mL and incubated for 2 h at 55°C. Later on, NaCl 2M was added, and it was centrifuged at 16 900 *g* for 15 min, the supernatant was recovered and precipitated with two volumes of cold etanol which was incubated at –20°C all night long; then it was centrifuged for 10 min at 15 300 *g* in order to obtain a tablet which was washed twice with etanol at 70%, during each wash it was centrifuged at 15 300 *g* for 5 min. The tablet was dried in a thermoblock at 55°C for 5 min and, finally, re-suspended in 90 µL of sterile water. The DNA's integrity was verified in agarose gel at 1%.^{19,20}

Results

Bacteriological analysis

Table 1 shows the isolates of *Salmonella* in Panela and Chihuahua type cheeses for sale on the streets. In the column corresponding to the tetrathionate enriched broth of the Panela type cheese samples, it can be observed that 16 of the 30 samples coming from markets "A" and "B" were classified as suspicious while being cultivated in agar XLD; meanwhile, on the Hektoen agar, for market "A" and for "B", 12 of the 30 samples were suspicious. A remarkable difference was observed in samples cultivated in the selenite-cystine enrichment broth since only four samples from market "A" turn out suspicious when cultivated on XLD agar and none of the 30 corresponding to this market was suspicious on Hektoen agar. For market "B", 12 of the enriched in selenite-cystin were suspicious on XLD agar, as well as on the Hektoen agar. On the other hand, of the 30 samples of Chihuahua type cheese from market "C", only one resulted suspicious to the culture on enteric Hektoen agar, coming from the tetrathionate broth; that sample also turned out suspicious when cultured, from selenite-cystin broth, on Hektoen and XLD agar.

From the culture of the tetrathionate to the XLD and Hektoen medium, only one sample was suspi-

Los productos de la PCR se observaron en geles de agarosa al 2.5%.¹⁷ Las condiciones para la amplificación simultánea fueron: 94°C para desnaturalización, 53°C para alineamiento y 72°C para la extensión.

Capacidad de amplificación de ADN bacteriano en muestras inoculadas

Para determinar la rapidez y la capacidad de amplificación de la PCR múltiple a partir de ADN bacteriano presente en las muestras, se determinó utilizar una concentración bacteriana de 30 UFC/mL. Se emplearon diez muestras inoculadas, y se desarrolló la metodología específica para la obtención del ADN bacteriano a partir de ellas. De las diez muestras, cinco fueron de quesos tipo panela y cinco de queso tipo Chihuahua.

Se hicieron las siguientes modificaciones al protocolo de extracción de ADN de cultivos bacterianos puros,¹⁸ se tomaron 10 mL de la solución homogeneizada para la obtención del ADN bacteriano, se centrifugó a 1 200 *g* durante 5 min para precipitar las de partículas de alimento; se recuperó el sobrenadante, se centrifugó a 4 600 *g* durante 10 min a 4°C, para obtener una pastilla de las bacterias inoculadas, ésta se resuspendió en solución de lisis (8% sacarosa, 5% tritón X –100, 50 mM EDTA, 50 mM tris-HCl pH 8) y se aumentó el tiempo de exposición de 10 a 20 min. Se utilizó lisozima a 1.5 µg/mL incubada a temperatura ambiente 30 min; se hirvió durante 1 min en baño María para desactivar la lisozima; se agregó RNasa a 15 µg/mL y se incubó 1 h a 37°C; se empleó proteínasa K a 10 µg/mL y se incubó por 2 h a 55°C. Posteriormente, se adicionó NaCl 2M, y se centrifugó a 16 900 *g* durante 15 min, se recuperó el sobrenadante y se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto frío que se incubó a –20°C toda la noche; luego se centrifugó durante 10 min a 15 300 *g* para obtener una pastilla que se lavó en dos ocasiones con etanol al 70%, en cada lavado se centrifugó a 15 300 *g* durante 5 min. La pastilla obtenida se secó en termoblock a 55°C por 5 min y finalmente se resuspendió en 90 µL de agua estéril. La integridad del ADN obtenido se verificó en gel de agarosa al 1%.^{19,20}

Resultados

Análisis bacteriológico

En el Cuadro 1 se muestran los aislamientos de *Salmonella* en quesos tipos panela y Chihuahua de venta en mercados sobre ruedas. En la columna que corresponde al caldo de enriquecimiento tetrathionato de las muestras de queso tipo panela, se observa que 16 de las 30 muestras procedentes de los mercados "A" y "B"

cious; meanwhile, as a result of the selenite-cystin growth on XLD agar four samples resulted uncertain, in contrast to the Hecktoen agar, where only one of them generated colonies with these results.

Table 2 shows the results of the biochemical and serological tests for the identification of *Salmonella*. Of the 16 suspicious samples of Panela type cheese, due to its characteristic growth on the selective XLD and Hecktoen agars, coming from market "A", one was positive to the biochemical reaction on LIA agar. From market "B", ten of the 16 suspicious samples were positive on TSI agar, and seven of them on LIA agar.

The biochemical tests performed to the only suspicious sample of the microorganism isolate coming from market "C", resulted negative; while of four coming from market "D", one of them was positive to the TSI agar. In relation to the serological results, all samples resulted negative to the test.

Table 3 shows that 16 of the 30 samples of Panela type cheese coming from market "A" were classified as suspicious when cultivated on Palcam agar for the isolate of *L. monocytogenes*. The same number resulted from the samples coming from market "B", also from Panela type cheese.

In relation to the microorganism's isolate in the Chihuahua cheese samples, none coming from market "C" resulted suspicious, and only one came from market "D".

In table 4 the results of the biochemical tests for identification of *L. monocytogenes* are showed. In relation to market "A", the four samples of Panela type cheese were positive to the fermentation of manitol, dextrose and sorbitol sugars; while only three of those fermented maltose. The four samples coming from market "B, suspicious in the Palcam agar culture, were positive for the test carbohydrates. In regard to the samples of Chihuahua type cheese, the only suspicious sample when cultured in Palcam medium,

se clasificaron como sospechosas al sembrarse en agar XLD; en tanto que en el agar Hektoen, para el mercado "A" y para el "B", 12 de las 30 muestras fueron sospechosas. Se observó notable diferencia en las muestras sembradas en el caldo de enriquecimiento selenito-cistina, pues sólo cuatro de las muestras del mercado "A" resultaron sospechosas al sembrarse en agar XLD y ninguna de las 30 correspondientes a este mercado fue sospechosa en el agar Hektoen. Para el mercado "B", 12 de las muestras enriquecidas en caldo selenito-cistina fueron sospechosas tanto en agar XLD como en agar Hektoen. Asimismo, de las 30 muestras de queso tipo Chihuahua procedentes del mercado "C", sólo una resultó sospechosa a la siembra en agar entérico Hektoen, procedente del caldo tetrationato; dicha muestra también fue sospechosa al sembrarse del caldo selenito-cistina al agar Hektoen y al agar XLD.

De la siembra del caldo tetrationato al medio XLD y Hektoen, sólo una muestra fue sospechosa, mientras que como resultado del crecimiento de caldo selenito-cistina al agar XLD, cuatro muestras resultaron dudosas, a diferencia del crecimiento en agar hektoen, donde sólo una de ellas generó colonias con ese resultado.

En el Cuadro 2 se muestran los resultados de las pruebas bioquímicas y de serología para la identificación de *Salmonella*. De las 16 muestras sospechosas de queso tipo panela, debido a su crecimiento característico en los agares selectivos XLD y Hektoen, procedentes del mercado "A", únicamente una fue positiva a la reacción bioquímica en agar LIA. Del mercado "B", diez de las 16 sospechosas fueron positivas en agar TSI, y siete de ellas en agar LIA.

Las pruebas bioquímicas realizadas a la única muestra sospechosa al aislamiento del microorganismo procedente del mercado "C" resultaron negativas; mientras que de las cuatro procedentes del mercado "D", una de ellas fue positiva en el agar TSI.

Cuadro 1
AISLAMIENTOS DE *Salmonella* SPP EN QUESOS TIPOS PANELA Y CHIHUAHUA
PROCEDENTES DE MERCADOS SOBRE RUEDAS DE LA CIUDAD DE MÉXICO
ISOLATES OF *Salmonella* SPP ON PANELA AND CHIHUAHUA TYPE CHEESES COMING
FROM THE STREET MARKETS OF MEXICO CITY

ENRICHED BROTHS					
Tetrationate			Selenite cistine		
SELECTIVE MEDIUMS					
Market	Number of samples	Suspicious on agar XLD	Suspicious on agar Hektoen	Suspicious on agar XLD	Suspicious on agar Hektoen
Panela cheese type					
A	30	16	12	4	0
B	30	16	12	12	12
Chihuahua cheese tpye					
C	30	0	1	1	1
D	30	1	1	4	1

Cuadro 2

IDENTIFICACIÓN DE *Salmonella* SPP MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y
SEROLOGÍA EN QUESOS TIPOS PANELA Y CHIHUAHUA PROCEDENTES
DE MERCADOS SOBRE RUEDAS EN LA CIUDAD DE MÉXICO
IDENTIFICATION OF *SALMONELLA* SPP BY MEANS OF BIOCHEMICAL TESTS AND
SEROLOGY ON PANELA AND CHIHUAHUA CHEESE TYPES COMING FROM STREET
MARKETS OF MEXICO CITY

Market	Positive serology	Number of samples	Biochemical tests SELECTIVE MEDIUMS	
			Positive to TSI	Positive to LIA
			Panela cheese type	
A		16	0	1
B		16	10	7
			Chihuahua cheese type	
C		1	0	0
D		4	1	0

coming from market “C”, generated negative results to the carbohydrate fermentation. In no case did the biochemical tests coincided with what the corresponding norms indicate for the identification of microorganisms

PCR technique

Specificity of the initiators and bacterial DNA amplification capacity on inoculated samples

In regard to the specificity of the selected indicators, no unspecific amplifications were observed on the assays done with DNA coming from *E. coli*, *S. cremoris* and *S. Aureus*, neither on those where gene *InvA*'s initiators with DNA of *L. monocytogenes* were employed, nor on those done with gene *lap* with DNA of *Salmonella*.

The amplification results were positive in both; gene *InvA* and gene *lap*, using inoculated samples with *Salmonella* and *L. monocytogenes*, respectively, at concentrations of 30 UFC/g (Figure 1).

Analysis by means of PCR

Three samples of Panela type cheese, corresponding to the third market, generated positive amplification results for the gene *InvA* from *Salmonella* (Figure 2). Only one of the three mentioned samples resulted suspicious when bacteriological analysis was done; nevertheless, generated negative results with TSI and serology.

The methodology for the use of the multiple PCR technique developed in this study requires 28 hours to achieve the detection of *Salmonella* and *L. monocytogenes*, separately or jointly.

For the detection of *Salmonella* by means of bac-

Respecto de los resultados por serología, todas las muestras resultaron negativas a la prueba.

El Cuadro 3 muestra que 16 de las 30 muestras de queso tipo panela procedentes del mercado “A” se clasificaron como sospechosas al ser sembradas en agar Palcam para el aislamiento de *L. monocytogenes*. El mismo número resultó de las muestras procedentes del mercado “B”, también de queso tipo panela.

En relación con el aislamiento del microorganismo en las muestras tipo Chihuahua, ninguna de las procedentes del mercado “C” resultó sospechosa, y sólo lo fue una del mercado “D”.

En el Cuadro 4 se presentan los resultados de las pruebas bioquímicas para identificar *L. monocytogenes*. En lo referente al mercado “A”, las cuatro muestras de queso tipo panela fueron positivas a la fermentación de azúcares manitol, dextrosa y sorbitol; mientras que sólo tres de ellas fermentaron la maltosa. Las cuatro muestras procedentes del mercado “B”, sospechosas en el cultivo en agar Palcam, fueron positivas a la fermentación de los carbohidratos de prueba. En cuanto a las muestras de queso tipo Chihuahua, la única muestra sospechosa al sembrarse en medio Palcam, procedente del mercado “D”, generó resultados negativos a la fermentación de los carbohidratos. En ningún caso las pruebas bioquímicas coincidieron con lo que señala la Norma correspondiente para la identificación del microorganismo.

Técnica de PCR

Especificidad de los iniciadores y capacidad de amplificación de ADN bacteriano en muestras inoculadas

En cuanto a la especificidad de los iniciadores seleccionados, no se observaron amplificaciones inespecíficas en los ensayos realizados con el ADN proveniente de *E.*

Cuadro 3
 AISLAMIENTOS DE *L. monocytogenes* EN QUESOS TIPOS PANELA Y CHIHUAHUA
 PROCEDENTES DE MERCADOS SOBRE RUEDAS EN LA CIUDAD DE MÉXICO
 ISOLATES OF *L. monocytogenes* ON PANELA AND CHIHUAHUA TYPE CHEESES COMING
 FROM STREET MARKETS OF MEXICO CITY

Market	Number of samples	Number of suspicious samples on agar Palcam
Panela type cheese		
A	30	16
B	30	16
Chihuahua type cheese		
C	30	0
D	30	1

Cuadro 4
 IDENTIFICACIÓN DE *L. monocytogenes* MEDIANTE PRUEBAS BIOQUÍMICAS EN QUESOS TIPOS
 PANELA Y CHIHUAHUA PROCEDENTES DE MERCADOS SOBRE RUEDAS EN LA CIUDAD DE MÉXICO
 IDENTIFICATION OF *L. monocytogenes* BY BIOCHEMICAL TESTS ON PANELA AND
 CHIHUAHUA TYPE CHEESES COMING FROM STREET MARKETS OF MEXICO CITY

Market	Number of samples	Mannitol positives	Dextrose positive	Maltose positive	Sorbitol positive
Panela type cheese					
A	4	0	1	1	0
B	4	10	7	7	0
Chihuahua type cheese					
C	0	0	0	0	0
D	1	1	0	0	0

teriological methods, it is necessary to wait seven days, while the detection for *L. monocytogenes* requires nine days.

Discussion

In spite of the inadequate handling and display conditions of the cheeses for sale, the negative results of the microbiological analyses lead to emphasize the relevance of the pasteurization process of the raw material, since *L. monocytogenes* has been isolated from raw milk, as Velazquez *et al.*²¹ point out. Nevertheless, the importance of the probability of ulterior contamination, due to the conditions of the places where the products are processed can not be lessen, as found by Solano and Hernandez,²² who detected *L. monocytogenes* (considered as an emergent microorganism in Mexico) in Chihuahua type cheese processing plant premises, where the study took place.

As for the detection of *Salmonella*, the fact that one sample turned out positive by means of bacteriological analysis, but generated negative to biochemical tests for its identification, is outstanding.

The results of this sample, in particular, are relevant because the PCR technique can be utilized, due to the probability that this may posses greater sensitivity than the bacteriological methods, because positive

coli, *Str. cremoris* y *Sta. aureus*, así como tampoco al realizar aquellos en que se emplearon los iniciadores del gen InvA con ADN de *L. monocytogenes*, ni en los que se realizaron con los iniciadores del gen Iap con el ADN de *Salmonella*.

Los resultados de amplificación tanto del gen InvA como del gen Iap empleando muestras inoculadas con *Salmonella* y *L. monocytogenes*, respectivamente, a concentraciones de 30 UFC/g, fueron positivos (Figura 1).

Análisis mediante PCR

Tres muestras de queso tipo panela, correspondientes al tercer mercado, generaron resultados de amplificación positivos para el gen InvA de *Salmonella* (Figura 2). Sólo una de las tres muestras mencionadas resultó sospechosa al analizarse bacteriológicamente; sin embargo, generó resultados negativos en TSI y serología.

La metodología para la utilización de la técnica de PCR múltiple desarrollada en este estudio requiere un total de 28 horas para lograr la detección de *Salmonella* y *L. monocytogenes*, ya sea por separado o en forma conjunta.

Para la detección de *Salmonella* por medio de los métodos bacteriológicos, es necesario esperar siete

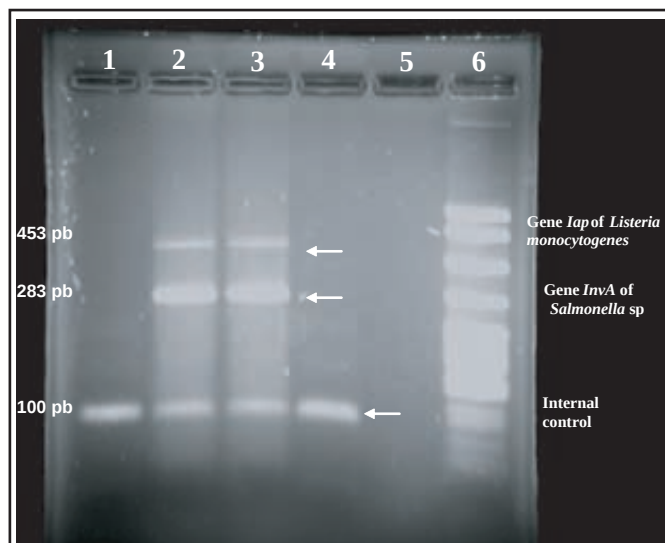


Figura 1: Determinación de las condiciones para la amplificación simultánea de ADN proveniente de *Salmonella* sp y *L. monocytogenes*: Carril 1, testigos negativo e interno. Carril 2 y 3, amplificación de ADN de ambos microorganismos y testigo interno. Carril 4, testigos negativo e interno. Carril 5, testigo negativo. Carril 6, marcador de peso molecular

Figure 1: Determination of the conditions for the simultaneous amplification of DNA from *Salmonella* sp and *L. monocytogenes*: Lane 1, negative control and internal control. Lane 2 and 3, amplification of DNA of both microorganisms and internal control. Lane 4, negative and internal control. Lane 5, negative control. Lane 6, marker of molecular weight.

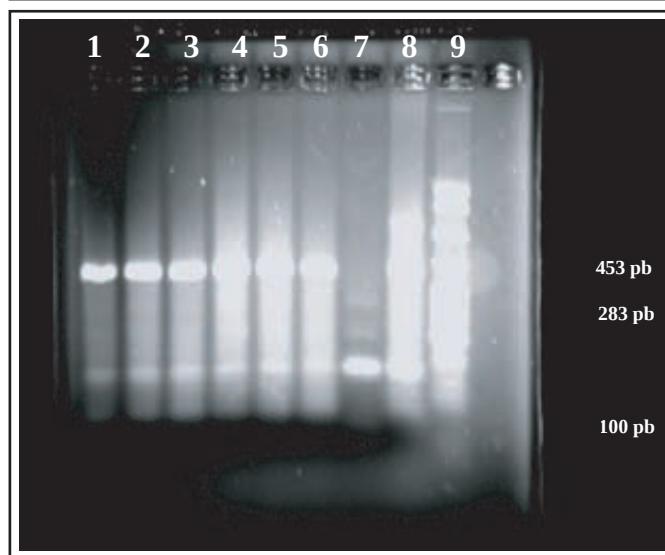


Figura 2: Carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6, muestras de queso tipo panela por duplicado, positivas por la amplificación de ADN de *Salmonella* sp, más testigo interno. Carril 7, únicamente testigo interno. Carril 8, testigo positivo, amplificación de ADN de ambos microorganismos y testigo interno. Carril 9, marcador de peso molecular.

Figure 2: Lanes 1, 2, 3, 4, 5, 6, samples of Panela type cheese by duplicate, positives for the amplification of DNA of *Salmonella* sp plus internal control. Lane 7, only internal control. Lane 8, positive control, amplification of DNA of both microorganisms and internal control. Lane 9, marker of molecular weight.

results were obtained, even at low concentrations, as the ones proven (30 UFC/g) in this study. It should be considered to obtain false positive results generated by DNA's remnants of bacterial cells after pasteurization, since it is possible to find bacterial DNA coming from dead or not viable cells for their multiplication. Besides, the minimum infectious doses as well as maximum limits should be considered, if they were permitted by the normatively that each case applies.

The developed PCR's methodology in this study, permitted the simultaneous amplification of DNA's fragments coming from *L. monocytogenes* and *Salmonella*. The amplification of such microorganisms was possible when its DNA was obtained from pure cultures and, later on, from contaminated samples. Nevertheless, in the case of the DNA obtained from artificial or natural contaminated samples, it was necessary to do modifications to the protocol of extraction that originally was used with pure cultures.²⁰

The multiple PCR technique, here proposed, only

días, en tanto que la detección de *L. monocytogenes* requiere nueve días.

Discusión

A pesar de que las condiciones en las que se encuentran los quesos para su venta y manejo son inadecuadas desde un enfoque sanitario, los resultados negativos del análisis microbiológico destacan la relevancia del proceso de pasteurización de la materia prima, pues en la leche cruda sí se ha aislado *L. monocytogenes*, como señalan Vázquez *et al.*²¹ No obstante, no puede restarse importancia a la probabilidad de la contaminación posterior debido a las condiciones de los sitios en que se procesan los productos, como informan Solano y Hernández,²² quienes detectaron *L. monocytogenes* (que es un microorganismo considerado como emergente en México) en instalaciones de plantas procesadoras de queso tipo Chihuahua, en donde se realizó su estudio.

requires 28 hours to detect *Salmonella* and *L. monocytogenes* in fresh type cheeses like semi-ripe, since it is not necessary to isolate and culture the microorganism, which requires seven days. It stands out that the time needed to obtain the PCR results includes the time of incubation of the samples, that, in the case of *L. monocytogenes*, it was reduced up to 24 hours, since for the detection of the microorganism on inert surfaces, the minimum time of necessary pre-enrichment is six hours,²³ while Manzano *et al.* utilized incubation times of 48 hours to obtain positive results of his artificially inoculated samples in food; or, studies as the ones made by Laberge,²⁴ in which, after 24 hours of incubation, the detection limits in cheese's samples fluctuated between 95 and 320 UFC/g. Likewise, Ericsson and Stalhandske²⁵ tested with different incubation's times for the microorganism and proposed the use of a minimum of six hours, and just as Laberge²⁴ and Nada,²³ they point out that while diminishing the time, the capacity to obtain positive results decreases.

In relation to the limitations of the technique's use due to inhibitor factors of food, some authors like Wang *et al.*¹³ report to have detected interference, probably related to hydrolyzed casein's concentration, as being proposed by Bickley,²⁶ as well as some compounds of the enriched broth LEB, trouble that could be controlled in this study with the methodology of modified extraction, which included the use of K proteinase enzyme, with the objective to eliminate remnants of protein generated by milk clotting during the obtainment of cheese, as well as to inhibit the action of endogenous nucleases, advantage that coincides with the use of the methodology proposed by Laberge.²⁴

The sensitivity limits were determined on 30 UFC/g of *Salmonella* and *L. monocytogenes*. Other methodologies as the essay of Amplisensor of Chen *et al.*²⁷ allow the detection limit up to 3 UFC/g of *Salmonella* per PCR, similar to the results obtained by Southern blot, which minimum value is of up to 9 UFC/g,²⁸ results that only apply to detection of microorganisms by separate, in contrast to the present study which proposes to perform it in conjoint or multiple way.

Likewise, initiators were selected that allowed the amplification of a fragment of gene *lap* to detect and identify *L. monocytogenes*. These initiators have been tested by Manzano *et al.*,¹⁶ who verified the sensitivity with the same bacterial charge that was used in this study; that is, 30 UFC/g, concentration which allowed the DNA's amplification of the microorganism on cheeses' samples; this concentration also coincides with the determinations of Hien¹⁴ and Mckillip,²⁹ who developed an extraction method of bacterial DNA from artificially contaminated samples.

Given the sensitivity and speed for the obtainment of results by the PCR technique, it is feasible to pro-

Respecto de la detección de *Salmonella*, destaca el hecho de que una de las muestras que resultó positiva por medio de la PCR, se encontró sospechosa mediante el análisis bacteriológico; sin embargo, generó resultados negativos a las pruebas bioquímicas para su identificación.

Los resultados de esta muestra son relevantes debido a que aquí tiene cabida la utilización de la técnica de PCR, dada la probabilidad de que ésta posea mayor sensibilidad que los métodos bacteriológicos, pues se obtuvieron resultados positivos, aun a bajas concentraciones, como las que fueron probadas (30 UFC/g) en este estudio. Deberá considerarse la posibilidad de obtener resultados falsos positivos generados por remanentes de ADN de células bacterianas tras la pasteurización, pues es posible hallar ADN bacteriano proveniente de células muertas o células no viables para su multiplicación. Además, deberá contemplarse tanto la dosis mínima infectante como límites máximos, si se llegaran a permitir por la normatividad que aplique en cada caso.

La metodología de la PCR desarrollada en este estudio, permitió la amplificación simultánea de fragmentos de ADN proveniente de *L. monocytogenes* y *Salmonella*. La amplificación de tales microorganismos fue posible tanto cuando su ADN se obtuvo a partir de cultivos puros, como cuando fue obtenido de muestras contaminadas. Sin embargo, en el caso del ADN obtenido de las muestras contaminadas tanto artificial como naturalmente, fue necesario realizar modificaciones al protocolo de extracción que originalmente se había empleado con los cultivos puros.²⁰

La técnica de PCR múltiple aquí propuesta requiere sólo de 28 horas para detectar tanto *Salmonella* como *L. monocytogenes* en quesos de tipo fresco como semimadurado, pues no es necesario realizar el aislamiento y el cultivo del microorganismo, lo cual requiere de siete días. Es importante señalar que el tiempo que se requiere para la obtención de resultados por PCR incluye el tiempo de incubación de las muestras, que en el caso de *L. monocytogenes* pudo reducirse hasta 24 horas, ya que incluso para la detección del microorganismo en superficies inertes, el tiempo mínimo de preenriquecimiento necesario es de seis horas,²³ en tanto que en los alimentos, por ejemplo, Manzano *et al.*¹⁶ emplearon tiempos de incubación de 48 horas para obtener resultados positivos de sus muestras inoculadas artificialmente; o bien estudios como el de Laberge,²⁴ en que tras 24 horas de incubación, los límites de detección en muestras de quesos estuvieron entre 95 y 320 UFC/g. Por su parte, Ericsson y Stalhandske²⁵ probaron con distintos tiempos de incubación para el microorganismo y proponen un empleo mínimo de seis horas, y al igual que Laberge²⁴ y Nada,²³ señalan que al disminuir el tiempo, la capa-

pose its application as a preliminary test with official character and not only as a confirmative test, as it has been utilized, only selecting the samples that resulted positive, in order to continue its analysis by traditional bacteriological methods, this could reverberate in the optimization of time and resources for the obtainment of results and decision making.

Acknowledgements

The present study has been financed by the Support Program for Technological Investigation and Innovation Projects (PAPIIT), number IN226798. Special thanks to QFB Mireya Nicoli Tolsa and biologist Amanda Gayosso Vazquez for its collaboration.

Referencias

1. Mensah P, Yeboah MD, Owusu DK, Ablordey A. Street foods in Accra, Ghana: how safe are they? Proceedings of Developing a food safety strategy 1999 July; Ginebra, Suiza. Ginebra, Suiza: WHO, 2001.
2. Caballero TA, Carrera VA, Legomin FE. Evaluación de la vigilancia microbiológica de alimentos que se venden en las calles. *Rev Cubana Aliment Nutr* 1998;12:7-10.
3. Bryan JF, Michanie SC, Alvarez P, Paniagua A. Critical control points of street-vended foods in the Dominican Republic. *Food Prot* 1988;51:373-383.
4. Umoh VJ, Odoaba MB. Safety and quality evaluation of street foods sold in Zaria, Nigeria. *Food Contr* 1999;10:9-14.
5. Mosupye FM, von Holy A. Microbiological quality and safety of street-vended foods in Johannesburg city, South Africa. *Food Prot* 1999;62:1278-1284.
6. Juárez M. Quesos mexicanos: toda una tradición. Reportajes FMVZ (serial online). (Cited 2002 Jul 7). Available from: URL: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/reportajes/quesos/quesos.htm>
7. Méndez R, Namihira G, Moreno A, Sosa M. El protocolo de investigación. México (DF): Trillas, 1996.
8. Secretaría de Salud. NOM-109-SSA1-1994. Manual sobre los Procedimientos para la toma, manejo y transporte de muestras de alimentos. México (DF): Secretaría de Salud, 1994.
9. Secretaría de Salud. NOM-114-SSA1-1994. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos. México, D.F. Secretaría de Salud, 1994.
10. Secretaría de Salud. NOM-143-SSA1-1995. Método de prueba microbiológico para alimentos. Determinación de *L. monocytogenes*. México, D.F. Secretaría de Salud, 1995.
11. Galan J, Ginocchio C, Costeas P. Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene InvA: homology of InvA to members of a new protein family. *Bacteriol* 1998;174:4338-4349.
12. Nguyen AV, Khan MY, Lu Z. Amplification of *Salmonella* chromosomal DNA using the polymerase chain reaction. *Avian Dis* 1994;38:119-126.

idad para detectar resultados positivos disminuye.

En lo que concierne a las limitantes del uso de la técnica debidas a factores inhibitorios propios del alimento, Wang *et al.*¹³ señalan haber detectado interferencias probablemente relacionadas con la concentración de caseína hidrolizada, según lo propuesto por Bickley,²⁶ así como algunos componentes del caldo de enriquecimiento LEB; esa problemática pudo controlarse en este estudio con la metodología de extracción modificada, que incluyó el empleo de la enzima proteínasa K, con el fin de eliminar remanentes de proteína generados por la coagulación de la leche durante la obtención del queso, así como de inhibir la acción de las nucleasas endógenas, dicha ventaja coincide con el empleo de la metodología propuesta por Laberge.²⁴

Los límites de la sensibilidad se determinaron en 30 UFC/g tanto de *Salmonella* como de *L. monocytogenes*. Otras metodologías como el ensayo Amplisensor de Chen *et al.*²⁷ permiten la detección límite de hasta 3 UFC/g de *Salmonella* por PCR, lo cual es similar a los resultados obtenidos por Southern blot, cuyo valor mínimo es de hasta 9 UFC/g,²⁸ esos resultados sólo aplican en la detección de los microorganismos por separado, a diferencia del presente estudio que propone hacerlo en forma conjunta o múltiple.

En este contexto, se seleccionaron iniciadores que permiten la amplificación de un fragmento del gen *lap* para detectar e identificar *L. monocytogenes*. Estos iniciadores han sido probados por Manzano *et al.*,¹⁶ quienes comprobaron la sensibilidad con la misma carga bacteriana que se empleó en este estudio, o sea 30 UFC/g, dicha concentración permitió la amplificación del ADN del microorganismo en muestras de quesos; tal concentración también coincide con las determinaciones de Hein¹⁴ y Mckillip,²⁹ quienes desarrollaron un método de extracción de ADN bacteriano partiendo de muestras contaminadas artificialmente.

Dada la sensibilidad y rapidez para la obtención de resultados mediante la técnica de PCR, es factible proponer su aplicación como prueba preliminar con carácter oficial y no sólo como prueba confirmatoria, como hasta el momento se ha utilizado, seleccionando solamente aquellas muestras que resultasen positivas para continuar su análisis por métodos bacteriológicos tradicionales, ello podría repercutir en la optimización de tiempo y recursos para la obtención de resultados y toma de decisiones.

Agradecimientos

El presente estudio lo financió el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) IN226798. Se agradece a la QFB Mireya Nicoli Tolosa y a la bióloga Amanda Gayosso Vázquez su valiosa colaboración en este proyecto.

13. Wang R, Cao W, Johnson M. 16S rRNA-base probes and Polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2827-2831.
14. Hein I, Klein D, Lehner A, Bubert A, Brandl E, Wagner M. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Res Microbiol* 2001;152:37-46.
15. Köhler SM, Leimeister-Wächter T, Chakraborty F, Lotzpeich D, Goebel W. The gene coding for protein p60 of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 1990; 175:3491-3501.
16. Manzano M, Cocolin L, Cantoni C, Comi G. Detection and identification of *Listeria monocytogenes* from milk and Cheese by a single-step PCR. *Mol Biotech* 1997;7:85-87.
17. Silhavy T, Berman M, Enquist J. Experiments with gene fusions. NY, USA: Coldspring harbor laboratory Press, 1984.
18. Erlich HA. PRC technology, principles and applications for DNA amplification. NY, USA: Oxford University Press, 1992.
19. Ausubel F, Brent R, Kingston R, Moore D, Seidman J, Smith J *et al.*, editors. Short protocols in Molecular Biology. NY, USA: Green Publishing Associates and John Wiley and sons, 1992.
20. Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning a Laboratory Manual. NY, USA: Coldspring harbor laboratory Press, 1989.
21. Vazquez S, Rodas S, Quiñones R. Occurrence of *Listeria* species in raw milk in farms of the outskirts of Mexico City. *Food Microbiol* 2001;18:177-181.
22. Solano, Hernandez S. Behaviour of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Manchego and Chihuahua mexican cheeses. *Int J Food Microbiol* 2000;62:149-153.
23. Nada B, Batt C. A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non-radioactive detection of *Listeria monocytogenes*. *Mol Cel Probes* 1997;7:243-149.
24. Laberge I, Blais B, Pandian S. Detection of *Listeria monocytogenes* inoculated in dairy products by AmpliS-crypt. *Food Microbiol* 1997;14:283-290.
25. Ericsson H, Stalhandske P. PCR detection of *Listeria monocytogenes* in "gravad" rainbow trout. *Int J Food Microbiol* 1997;35:281-285.
26. Bickley J, Short J, McDowell D, Parkes H. Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Lett Appl Microbiol* 1996;22:153-158.
27. Chen S, Yee A, Griffiths K, Wang C, Rahn K, De Grandis S. A rapid, sensitive and automated method for detection of *Salmonella* species in foods using AG9600 Amplisensor Analyzer. *J Appl Microbiol* 1997;83:314-321.
28. Stone G, Orbest R, Hays M, McVey S, Chengappa M. Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. *J Clin Microbiol* 1994;32:1742-1749.
29. McKillip J, Jaykus L, Drake M. DNA extraction method from artificially contaminated food. Proceedings of the Annual Meeting of the Institute of Food Technologists 1999 Oct 10-12; Mississippi, Alabama. Mississippi. Mississippi (Alabama) Mississippi: SDFRC Publications, 1999:186.