



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes*
en leche de cabra: Control y Prevención de riesgos a
nivel granja.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
INGENIERA EN ALIMENTOS**

**P R E S E N T A:
NORA CECILIA OSORNIO RUIZ**

Asesora: Dra. Clara Inés Álvarez Manrique

Coasesora: Dra. Guicela Ramírez Bernal

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2017.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. S. C.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* en leche de cabra: Control y Prevención de riesgos a nivel granja.

Que presenta la pasante: **Nora Cecilia Osornio Ruiz**

Con número de cuenta: 411093093 para obtener el Título de la carrera: Ingeniería en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 13 de Septiembre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Clara Inés Álvarez Manrique	
VOCAL	M. en C. María Guadalupe Amaya León	
SECRETARIO	M. en C. Ana María Soto Bautista	
1er. SUPLENTE	M. en C. Ana María Sabina De la Cruz Javier	
2do. SUPLENTE	Dr. Enrique Fuentes Prado	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

DEDICATORIAS

A Dios por haberme dado fuerzas y esperanza para poder cumplir mi meta de ser profesionista.

A mi madre porque sé que a pesar de las circunstancias siempre estuviste allí, por luchar para darme la educación que tengo.

A mis hermanos Miguel, por ser mi alegría y a Jesús Eduardo, sé que desde el cielo me cuidas.

A mi abuela Aurora por ayudarme a crecer y ser la mujer que soy ahora, gracias donde quiera que estés.

A todos mis amigos de generación, por su ayuda incondicional.

A Emma, porque en esta última etapa me animaste mucho con tu cariño y comprensión.

A mis sinodales:

A la Dra. Clarita, usted es la pieza fundamental de todo este logro, por las enseñanzas tanto académicas como personales, que usted con tanto cariño me da, por la paciencia y la manera de impulsarme a ser siempre mejor, Gracias infinitas.

A la Dra. Guicela Ramírez, por su apoyo incondicional desde el inicio de este proyecto, por hacerlo crecer y ayudarme tanto profesionalmente y personalmente.

A mis demás sinodales, las maestras Ana María Soto y Ana María de la Cruz, por cada uno de sus consejos y comprensión a lo largo de este y demás trabajos. Les estoy profundamente agradecida; de igual manera a la Mtra. Amaya León y al Dr. Enrique Fuentes por el entusiasmo en recibir mi trabajo y el tiempo compartido.

A la FES Cuautitlán y a la UNAM, es un gran orgullo para mí el haberme formado profesionalmente en tan excelente institución.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES	3
1.1 El género <i>Listeria</i>	3
1.1.1 Antecedentes históricos	6
1.1.1.1 <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos y brotes	7
1.1.1.2 Panorama actual de <i>L. monocytogenes</i> en alimentos	9
1.1.1.3 Impacto de <i>L. monocytogenes</i> sobre la salud pública	10
1.1.1.4 Características generales de <i>Listeria monocytogenes</i>	10
1.1.1.5 Patogenia y Virulencia	13
1.1.1.6 Listeriosis	15
1.1.1.7 Listeriosis humana	16
1.1.1.8 Listeriosis clínica o animal	18
1.2 Marco jurídico para la prevención y control de la transmisión de <i>L. monocytogenes</i> hacia alimentos	18
1.3 Cabras	20
1.3.1 Producción de leche	20
1.3.1.1 Sistemas de producción de caprinos	20
1.3.1.2 Distribución mundial de las cabras lecheras	21
1.3.1.3 Producción de leche caprina en México	22
1.3.2 La leche de cabra	23
1.3.2.1 Definición y características organolépticas	23
1.3.2.2 Composición nutricional de la leche de cabra	24
1.3.2.3 Leche como materia prima	26
1.4 Prevención y control por presencia de <i>Listeria</i> en leche de cabra	27

1.4.1 Bienestar y manejo de las cabras lecheras	27
1.4.1.2 Higiene en el agua para consumo en la granja	29
1.4.2 Higiene del ordeño	29
1.4.2.1 Equipo de ordeño y utensilios	30
1.4.3 Instalaciones	30
1.4.3.1 Mantenimiento y limpieza de instalaciones	31
1.4.4 Manejo e inocuidad de la leche	32
1.4.4.1 Almacenamiento	32
1.4.4.2 Equipo e instalaciones para el almacenamiento de la leche	33
1.4.4.3 Controles del tiempo y la temperatura	33
1.4.5 Personal de la granja	34
1.4.6 Control de los peligros alimentarios	34
1.4.6.1 Identificación y evaluación de peligros	34
1.4.6.2 Selección de las medidas de control	35
CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA	36
2.1 Objetivos	36
2.1.1 General	36
2.1.2 Particulares	36
2.2 Materiales y métodos	36
2.2.1 La muestra	36
2.2.1.1 Reactivación de la posible presencia de <i>Listeria</i> en agua peptonada	37
2.2.2 Aislamiento microbiológico	38
2.2.2.1 Siembra, aislamiento y purificación de cepas sospechosas	39
2.2.3. Identificación mediante pruebas bioquímicas para el género <i>Listeria</i> y la especie <i>L. monocytogenes</i>	41
2.2.3.1 Tinción de Gram	41
2.2.3.2 Confirmación del Gram con KOH	42

2.2.3.3 Prueba de Catalasa	42
2.2.3.4 Prueba de Oxidasa	42
2.2.3.5 Prueba de OF (Oxidación-Fermentación)	43
2.2.3.6 Prueba de Voges-Proskauer (VP)	43
2.2.3.7 Prueba de Ureasa	44
2.2.3.8 Pruebas de fermentación de carbohidratos	44
2.2.4 Confirmación de la especie: Prueba con medio cromogénico específico para <i>Listerias</i> : BBL™ CHROMagar™ <i>Listeria</i>	46
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS	49
3.1 Resultados del objetivo particular 1	49
3.1.1 Aislamiento microbiológico de <i>Listeria monocytogenes</i>	49
3.2 Resultados del objetivo particular 2	52
3.2.1 Identificación del género	52
3.2.2 Identificación y confirmación de la especie <i>L. monocytogenes</i>	53
3.2.2.1 Pruebas bioquímicas: fermentación de carbohidratos	53
3.2.3 Confirmación de las especies mediante la prueba con medio cromogénico específico para <i>Listerias</i> : BBL™ CHROMagar™ <i>Listeria</i>	55
3.3 Resultados del objetivo particular 3	57
3.3.1 Propuesta de plan de control y prevención de riesgos por la presencia de <i>L.</i> <i>monocytogenes</i>	57
3.3.1.1 Presentación del plan	57
3.3.1.3 Análisis situacional	58
3.3.1.3 Implementación del plan	59
3.3.1.4 Evaluación y seguimiento	71
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	73
ANEXOS	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Miembros del género <i>Listeria</i>	4
Tabla 2. Diferenciación de especies de <i>Listeria</i> , <i>Corynebacterium</i> y el género <i>Erysipelothrix</i>	5
Tabla 3. Principales brotes por <i>Listeria monocytogenes</i> en alimentos	8
Tabla 4. Casos más recientes de listeriosis por alimentos	9
Tabla 5. Velocidad de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i>	11
Tabla 6. Producción de leche de cabra a nivel mundial	21
Tabla 7. Variaciones en la composición nutricional de la leche de diferentes especies	25
Tabla 8. Alimentos recomendables para caprinos	28
Tabla 9. Distribución de las muestras de leche de cabra	36
Tabla 10. Aislamientos sospechosos de <i>Listeria</i> a partir de muestras de leche de cabra	51
Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas para la selección de las cepas sospechosas de <i>Listeria</i>	52
Tabla 13. Resultados de la prueba de confirmación con medio cromogénico	56
Tabla 14. Criterio de evaluación para la lista de verificación aplicada a las granjas caprinas productoras de leche	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Listeria spp.</i>	3
Figura 2. Etapas del ciclo de vida intracelular de <i>L. monocytogenes</i>	13
Figura 3. Mecanismo virulento y patogénico de <i>L. monocytogenes</i> .	15
Figura 4. Propagación de la listeriosis en humanos	17
Figura 5. Cadena productiva de leche de cabra	26
Figura 6. Caldo Demi Fraser y ejemplo de placa con medio Oxford en presencia de <i>Listeria</i>	39
Figura 7. Procedimiento general para el aislamiento microbiológico de <i>Listeria</i>	40
Figura 8. Procedimiento general para la identificación del genero <i>Listeria</i> y sus especies	45
Figura 9. Reacción de color de CHROMagar BBL™ <i>Listeria</i>	47
Figura 10. Aspecto típico de las colonias en CHROMagar™ para la confirmación de especies de <i>Listeria</i>	47 47
Figura 11. Interpretación de resultados para medio cromogénico BBL™ CHROMagar <i>Listeria</i>	48
Figura 12. Reacción de esculina positiva en Demi Fraser	49
Figura 13. Colonias sospechosas de <i>Listeria</i> en medio OXFORD.	50
Figura 14. Colonias sospechosas en medio TSA.	50
Figura 15. Cepas aisladas en agar TSA.	50
Figura 16. Reacciones de pruebas de carbohidratos para la identificación de <i>L. monocytogenes</i>	54 54
Figura 17. Crecimiento de colonias de <i>Listeria</i> y ATCC 43249 en el medio Cromogénico	56
Figura 18. Etapas del plan de control y prevención de riesgos para granjas caprinas	57

ANEXOS

Anexo A. Lista de verificación	81
Anexo B. Formato de registro individual para caprinos	89
Anexo C. Comparación de síntomas de cabras sanas y con listeriosis	90
Anexo D. Registro para tratamiento de listeriosis en cabras	90
Anexo E. Formato para el registro de alimentos para el ganado caprino	91
Anexo F. Soluciones sanitizantes para ordeña	91
Anexo G. Registro para la de limpieza y desinfección de equipo (ordeña mecánica)	92
Anexo H. Formato de registro de temperatura de la leche para almacenamiento	92

RESUMEN

El presente trabajo muestra el aislamiento e identificación de la bacteria *Listeria monocytogenes* en algunas granjas productoras de leche de cabra, provenientes de Chiapas. *Listeria* es una bacteria patógena que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en los últimos años ha sido uno de los problemas emergentes en la producción de leche en México y se ha reconocido como un patógeno causante de enfermedades graves en animales, humanos inmunocomprometidos y vulnerables, sin excluir al resto de la población, causando una de las enfermedades de transmisión por alimentos más graves debido a las pérdidas económicas y muertes que causa, la listeriosis.

Debido al impacto que tiene la presencia de este patógeno en los alimentos se lleva a cabo una propuesta de un plan para controlar y prevenir el riesgo del patógeno en un sistema de producción de leche caprina, muy común en nuestro país, con el fin de evitar brotes y diseminación en animales sanos y personal involucrado y de la misma manera asegurar la inocuidad de la leche de cabra.

INTRODUCCIÓN

La leche cruda es un medio propicio para el crecimiento de microorganismos, la frecuencia de enfermedades gastrointestinales ocasionadas por el consumo de esta leche o sus derivados contaminados, ha puesto en manifiesto la importancia de evaluar las condiciones en su ordeño, transporte y procesamiento. Diversos microorganismos se han asociado a brotes, siendo *Salmonella* spp., el microorganismo con mayor frecuencia de aislamientos, debido a los diversos reservorios que posee, sin embargo *L. monocytogenes* por la alta tasa de mortalidad que presenta (el 20-30%), ha llamado la atención de la comunidad científica (Albarracín, Poutou & Carrascal, 2008).

Este microorganismo es reconocido como zoonótico siendo sus principales reservorios los mamíferos y rumiantes, ha estado implicado en brotes asociados al consumo de leche y quesos frescos, las cabras que producen la leche pueden ser portadoras asintomáticas y excretar el microorganismo durante los procesos de mastitis. En las leches aparentemente normales *Listeria* spp., se puede encontrar en bajas concentraciones, lo cual puede ser una fuente de transmisión de listeriosis (Muñoz et al., 2013).

En México no hay gran variedad de estudios que demuestren la incidencia de *L. monocytogenes* en leche de cabra y productos derivados debido a que se ha hecho un incorrecto diagnóstico de la enfermedad y tampoco se tiene una adecuada evaluación de los riesgos potenciales que tiene tanto en la salud del personal de la granja como la afectación de las cabras y la posible transmisión del patógeno a la leche; por lo tanto es de importancia la implementación de medidas que sean eficaces para prevenir y controlar los riesgos de contaminación por esta bacteria garantizando la inocuidad del alimento desde la producción primaria (Castañeda et al., 2014).

Esta serie de medidas de control y prevención se basan en la normatividad nacional e internacional, con el fin de mantener la seguridad en el establo, evitar la contaminación de la materia prima y prevenir un problema de salud pública (Cofre, 2001).

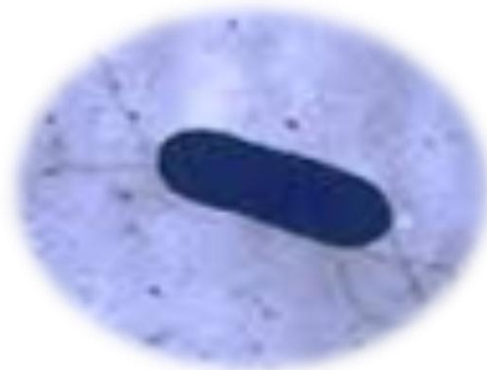
CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

1.1 El género *Listeria*

Se denomina así en honor al cirujano británico Lord Josep Lister, quien fue pionero en el año de 1860 en el concepto de cirugía antiséptica (Bell & Kyriankides, 2000), las bacterias de este género son Gram positivas, presentan metabolismo aeróbico, es decir usan el oxígeno como aceptor final de electrones para obtener energía, dependiendo de las condiciones del medio pueden crecer en condiciones anaeróbicas (ausencia de oxígeno), por lo que se les conoce como anaerobias facultativas (Domínguez, 2008).

Tienen forma cocobacilar (ver figura 1), con un tamaño aproximado de 0.4 a 0.5 μm x 1-1.5 μm , no es formadora de esporas, tiene un contenido relativamente bajo de Guanina y Citosina (G+C) del 36 al 39%, además de la habilidad para crecer en un amplio rango de temperaturas (0-45°C) y pH de 4.4; puede sobrevivir en concentraciones elevadas de Cloruro de Sodio (20-30%) (Ramírez, 2007; Escobedo, 2014).

Figura 1. *Listeria spp.*



(OIE, 2004).

El género *Listeria* se ha dividido en siete especies con dos grupos genéticamente diferentes (ver tabla 1), en un grupo están: *L. grayi*, subespecie *grayi* y *L. murrayi*, las cuales son poco frecuentes y hasta ahora son consideradas no patógenas, una nueva especie *L. rocourtiae*: las otras cinco especies están genómicamente relacionadas e incluyen tres especies hemolíticas: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* subespecie *londinenses*, *L. ivanovii* subespecie *ivanovii*, y dos especies no hemolíticas: *L. innocua* y *L. welshimeri* (Díaz et al., 2015).

Sólo las dos especies *L. ivanovii* y *L. monocytogenes*, han sido consideradas patógenas hasta ahora, esta última es un patógeno intracelular facultativo de humanos y animales, mientras que *L. ivanovii* infecta principalmente animales y las otras cuatro especies son esencialmente saprófitas, es decir que se han adaptado a una vida libre en tierra y vegetación en descomposición (Ramírez, 2014).

Tabla 1. Miembros del género *Listeria*

Especies de <i>Listeria</i>	Nombre anterior de la especie	Origen del nombre de la Especie
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Bacterium monocytogenes</i>	Aumenta la producción de monocitos.
<i>Listeria innocua</i>		Innocua/ inofensiva.
<i>Listeria welshimeri</i>		En honor a H.J. Welshimeri, bacteriólogo americano.
<i>Listeria seeligeri</i>		En honor a H.P.R. Seeliger, bacteriólogo alemán.
<i>Listeria grayi</i>	<i>L. grayi</i> , <i>L. murrayi</i>	En honor a M.L. Gray, bacteriólogo americano.
<i>L. rocourtiae</i>		En honor a Rocourt, bacteriólogo alemán.
<i>Listeria ivanovii</i>	<i>L. ivanovii</i> <i>L. monocytogenes</i>	En honor a I. Ivanov, bacteriólogo búlgaro.

(Bell & Kyriankides, 2000).

Este género está estrechamente relacionado con los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus* y a veces, puede confundirse con otros como *Corynebacterium* y *Erysipelothrix*, dado que el microorganismo comparte características morfológicamente similares a estos géneros, y debe ser diferenciada de ellos mediante pruebas bioquímicas; como se puede observar en la tabla 2, para su identificación y así constatar que efectivamente se trata de *Listeria* (Domínguez, 2008)

Tabla 2. Diferenciación de especies de *Listeria*, *Corynebacterium* y el género *Erysipelothrix*

ESPECIE \ PRUEBA	<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. seeligeri</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>C. bovis</i>	<i>C. jeikeium</i>	<i>C. matruchotii</i>	<i>C. renale</i>	<i>C. vitarumen</i>	<i>C. aquaticum</i>	<i>Erysipelothrix</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	/
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
OF de la glucosa	F	F	F	F	F	F	NF	NF	NF	F	F	O	O
Voges Proskauer (VP)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	/
Glucosa	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A ^V	V
Lactosa	V	A	A	A	/	/	V	-	-	-	V	V	A
Manitol	-	A	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/
Manosa	/	/	/	/	/	/	-	-	-	A	A	A ^V	-
Rafinosa	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	-	-	/
Ribosa	-	V	-	A	-	-	-	A	A	A	V	/	/
Salicina	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	A	/	/
Sacarosa	/	/	/	/	/	/	-	-	-	-	A	A ^V	-
Xilosa	-	-	-	A	A	A	-	-	-	-	/	V	-
Hidrolisis de Esculina	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-
Licuefacción de la Gelatina 22 °C	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-	-	V	-
Hidrolisis del hipurato	+	-	+	+	/	/	+	/	+	+	-	/	/
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	/	/
Ureasa	+	+	+	+	+	+	V-	-	V	+	+	-	-
CAMP	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/	+

(Mac Faddin, 2003; Barrow & Feltham, 2003).

-, Prueba negativa; +, Prueba positiva; /, No se dispone de resultados; F, Fermenta; NF, No fermenta; O, Oxida; A, Producción de ácido; V, Resultados Variables; A^V, Producción de ácido con resultados variables; V⁻, Variable por lo común negativo.

1.1.1 Antecedentes históricos

En el año 1924 casi al final de la primera Guerra Mundial, G.D. Murray aisló bacilos Gram positivos de la sangre de conejos, investigando la causa de un brote en éstos animales de laboratorio; al no poder asignar los aislados en alguno de los géneros conocidos en esa época, llamó al microorganismo *Bacterium monocytogenes* debido a la observación de monocitosis (multiplicación de monocitos en la sangre) para luchar contra las enfermedades infecciosas (Muñoz et al., 2013).

El primer caso de listeriosis humana documentado que involucró a un soldado quien padecía meningitis fue en 1929, este se aisló de la sangre de 3 pacientes y fue hasta 1940 que J.H. Pirie da la denominación actual de *Listeria monocytogenes* al patógeno; sin embargo, éste vuelve a recibir atención después de la Segunda Guerra Mundial, cuando se le describió como una importante causa de septicemia neonatal y meningitis en Alemania Oriental en 1949 (Aréchiga et al., 2008).

En el Instituto de Patología de la Universidad de Halle se detectaron histopatológicamente varios granulomas en 85 neonatos en pulmones, hígado, bazo, cerebro y en la piel; el bacteriólogo J. Potel aisló la bacteria de la sangre y otros órganos clasificando a la bacteria en el género *Corynebacterium*; al mismo tiempo casos similares fueron observados en la Universidad de Bonn y H.P.R. Seeliger estudió las bacterias aisladas detectando una movilidad que no era característica de *Corynebacterium* sino de *Listeria* (Bell & Kyriankides, 2000).

En los años sesenta, Seeliger realizó un gran esfuerzo para informar al público acerca de la relación *Listeria*-listeriosis; como investigador pionero, acumuló cerca de 6000 aislados procedentes de todas partes del mundo, una aparente similitud entre las muestras sugirió que el género *Listeria* estaba representado sólo por la especie *L. monocytogenes*; por medio de anticuerpos específicos contra antígenos en la pared celular así como contra antígenos en el flagelo, más del 60% de las cepas pudieron ser clasificadas en grupos específicos llamados serosas, éste importante avance en ése entonces significó mucho en cuanto al desarrollo de la serología aplicada como parte de los métodos de clasificación en bacterias o serotipificación molecular (Martí, 2002; Ramírez 2014).

Más adelante Rocourt, en colaboración con el Dr. Seeliger, separó a *Listeria monocytogenes* de otras especies de *Listeria* mediante pruebas bioquímicas y posteriormente a través de análisis genéticos (Domínguez, 2008).

1.1.1.1 *Listeria monocytogenes* en alimentos y brotes

L. monocytogenes tiene una gran habilidad para sobrevivir y crecer bajo condiciones adversas, incluso en refrigeración, razón por la cual puede transmitirse a una amplia variedad de alimentos, particularmente en aquellos listos para el consumo o también conocidos como “alimentos rápidos” (Muñoz et al., 2013).

Desde el año 1966 se habían registrado algunas incidencias atribuidas a *Listeria* en alimentos y casos de intoxicación alimentaria que generaban un índice considerable de muertes por la ingestión de alimentos contaminados con el patógeno, no obstante los científicos de esos tiempos no estaban interesados en la incidencia de *Listeria* en productos destinados al consumo por humanos, principalmente porque tales productos no habían sido ligados positivamente a listeriosis humana (Silva, 2002).

En 1981 se demostró un caso mayor en donde 18 de 41 canadienses murieron por listeriosis después del consumo de ensalada de col, de la cual fue aislada e identificada la bacteria como *L. monocytogenes*, fue hasta 1985 cuando investigadores comenzaron a desarrollar más que un interés pasivo en el significado de su presencia en la salud pública (Domínguez, 2008; Ramírez 2007).

Posteriores brotes, fueron ligados a distintos alimentos, leche y derivados como quesos, ensaladas, carnes rojas, pescado, alimentos listos para el consumo, por ejemplo: nuggets de pollo o pescado y pechugas pre-cocidas, pero fue hasta el año 2001 cuando se anuncia la influencia de este agente patógeno en la salud pública a nivel mundial; durante los próximos años se reconocen datos epidemiológicos de algunos países desarrollados, como Estados Unidos, en donde se considera como un factor etiológico responsable de aproximadamente 2.500 casos y 500 muertes al año (Muñoz et al., 2013). En la tabla 3 se muestran algunos brotes importantes de listeriosis por ingestión de alimentos contaminados por *L. monocytogenes* en países desarrollados.

Tabla 3. Principales brotes por *Listeria monocytogenes* en alimentos

Año	País	Casos (muertes)	Alimento	Serotipo del brote
1983	USA	49 (14)	Leche pasteurizada	4 b
1983-87	Suiza	122 (34)	Queso vaquerin	4b
1985	USA	142 (48)	Queso fresco estilo mexicano	4b
1987-89	Reino Unido	>350(>90)	Pate belga	4b
1992	Nueva Zelanda	4 (2)	Mejillones ahumados	1/2a
1992	Francia	279 (63)	Lengua de cerdo con gelatina	4b
1994	USA	45 (0)	Leche chocolatada	1/2b
1995	Francia	20 (4)	Queso fresco elaborado con leche cruda	4b

(Bell & Kyriankides, 2000).

Otros trabajos han permitido ubicar como importantes reservorios potenciales a las granjas productoras de lácteos, si se consideran sus resultados: *L. monocytogenes*, fue aislada en 56 muestras (6.5%) de 861 tanques que concentraban leche recibida de granjas de 21 estados en EUA; el 93% de los aislados correspondía a serotipos virulentos para humanos (Domínguez, 2008).

En Suecia, se aisló a *L. monocytogenes* en 3 de 294 muestras de leche cruda colectadas de los tanques de una planta procesadora de lácteos; una muestra detectó 60 UFC/ml del patógeno, en España se detectó *L. monocytogenes* en 37 de 1445 muestras colectadas de tanques que concentraban leche cruda de cabra procedente de 405 granjas, en Escocia la incidencia de *L. monocytogenes* en muestras de leche cruda colectadas de 180 tanques se estimó en un intervalo del 3-8% (Chavarías, 2006). Una evaluación posterior a 160 productores detectó al patógeno al menos una vez en 25 de ellos en tanto que sólo 7 fueron positivos en 3 o más de los 4 muestreos realizados durante el estudio (Martínez, 2007).

1.1.1.2 Panorama actual de *L. monocytogenes* en alimentos

Durante los últimos años, se han utilizado consideraciones comerciales en el desarrollo de alimentos, la fácil disponibilidad de materias primas y las nuevas aplicaciones junto con el desarrollo de tecnologías de procesado, envasado, sistemas de almacenamiento y distribución suponen un desafío continuo para los investigadores y tecnólogos de alimentos que idean y mantienen los controles de la seguridad de los alimentos (FAO/OMS, 2004).

De forma clara, debe incluirse en la lista de las bacterias patógenas incidentes en alimentos listos para el consumo a *Listeria monocytogenes* debido a la resistencia que presenta en el alimento durante el procesado como en el producto terminado (Bell & Kyriankides, 2000); en la tabla 4 se muestran algunos casos de incidencia de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo y la cuantificación de muertes por año.

Tabla 4. Casos más recientes de *Listeriosis* por alimentos

Año	País	Casos (muertes)	Alimento
2002	EUA	54 (11)	Pavo y pollo listo para el consumo
2008	Canadá	52 (20)	Carne envasada
2008-10	Chile	305 (45)	Alimentos variados
2011	EUA	147 (33)	Melones empacados
2012	EUA	22 (4)	Queso ricotta
2014	Dinamarca	20 (12)	Salchichas estilo Rullepolse
2015	EUA	2 (0)	Helado

(Turner, 2015)

Actualmente se asume que la contaminación de alimentos procesados, particularmente en lácteos, es consecuencia del contacto del producto con superficies colonizadas por cepas consideradas persistentes en el ambiente; tal resistencia se debe a una mayor capacidad de adhesión a las superficies por la bacteria, de manera que origina estructuras en forma de tapete o biopelículas, en plástico y acero inoxidable y demás materiales que son utilizados en equipos y recipientes durante la transformación del alimento (Domínguez, 2008).

La mayoría de las infecciones en humanos provocadas por alimentos son asociadas con alta prevalencia y de baja mortalidad, la situación es diferente para la listeriosis, la cual es una infección no común (asociada a una letalidad de hasta el 30%), hay un tiempo largo entre el

cual es ingerido el alimento y la persona enferma; además la enfermedad permanece siendo poco o mal diagnosticada sobre todo en el inicio de la infección (Ramírez, 2007).

1.1.1.3 Impacto de *L. monocytogenes* sobre la salud pública

La importancia de la incidencia que tiene la enfermedad producida por esta bacteria y la enfermedad que provoca conocida como listeriosis, debe su impacto clínico a la alta tasa de mortalidad y el efecto económico derivado de los brotes asociados con el consumo de alimentos. En México las fallas en los sistemas de vigilancia epidemiológicos son causa de información imprecisa sobre la incidencia de la listeriosis y sobre su caracterización como ETA (Enfermedad transmitida por alimentos) (Chavarrias, 2006).

La falta de datos exactos sobre esta bacteria plantea la necesidad de concientizar a las instancias correspondientes para definir estrategias de búsqueda intencionada de *L. monocytogenes* en alimentos y de la recopilación de información clínica precisa que permita conocer la importancia clínica y epidemiológica de la listeriosis en México (FAO/OMS, 2004).

1.1.1.4 Características generales de *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes así como las demás especies del género *Listeria* son células de extremos redondeados y a veces puntiagudos (cocobacilos), en ocasiones diplobacilares con tendencia a formar cadenas de 3 a 5 o más células teniendo, aspecto de “V” y/o empalizadas, no esporuladas, móviles, aerobias y capaces de crecer en condiciones de microaerofilia, es decir requiere niveles de oxígeno muy inferiores a los que se encuentran normalmente en la atmósfera de la tierra (Escobedo, 2014; NOM-143-SSA1, 1995).

En agar sangre da origen a colonias puntiformes, circulares, lisas y translúcidas de color azul grisáceo con una zona discreta de β -hemólisis, de 1 a 2 mm tras uno o dos días de incubación y lisas, suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas, pueden ser móviles cuando se cultivan a temperaturas de 20 a 25°C y ésta movilidad está provocada por la presencia de tres o cuatro flagelos de implantación periférica con longitudes de 6 a 20 μ m o más (Martí, 2002).

La movilidad es mucho menor o se pierde por completo al cultivar la bacteria a 37°C, los flagelos son altamente antigénicos y por ello se usan para producir anticuerpos que sirven en

inmuno-ensayos para la identificación de *L. monocytogenes* (Escobedo, 2014). En cultivos frescos, las células forman cadenas cortas, en condiciones de estrés, como en presencia de alto contenido de sal (>5%) o temperaturas elevadas (>45°C), las cadenas pueden parecer alargadas o en cadenas largas (Ray & Arun, 2010).

Carecen de cápsula y esporos con tinción Gram positiva, aunque en cultivos viejos pueden aparecer como Gram negativos al perder su capacidad de retener el colorante, también forman filamentos de 6-20 mm de longitud; al observarse las colonias con una de lupa de iluminación, con un ángulo de luz de 45°-60° de inclinación, se observan reflejos de color azul-verdoso sobre una superficie finamente granular (Martínez, 2007).

La temperatura óptima para el crecimiento de *L. monocytogenes* está entre 30°C y 37°C, aunque los límites en los cuales puede crecer o sobrevivir van desde 0,4°C a 45°C, así esta bacteria no sobrevive a temperaturas de 60°C durante 30 minutos, sin embargo si puede sobrevivir durante bastantes semanas a -18°C en diferentes substratos alimentarios (Martí, 2002).

Para su crecimiento (ver tabla 5), requiere de un pH neutro o ligeramente alcalino, siendo el ideal de 7.5 (Luna, 2011), este es el factor que más influye en la capacidad de *Listeria* para resistir las bajas temperaturas de congelación, así valores de pH inferiores a 4,74 hacen que *L. monocytogenes* muestre una disminución en la recuperación de células viables que han sido dañadas por el frío (Peralta, 2009).

Tabla 5. Velocidad de crecimiento de *L. monocytogenes*

Fase Lag					
Temperatura °C	0-1	2-3	5-6	7-8	9-10
Tiempo (días)	3-33	2-8	1-3	2	<1,5
Tiempo generación (UFC/ml)					
Temperatura °C	0-1		4-5		10-13
Tiempo (h)	62-13		13-25		5-9

(Bell & Kyriankides, 2000).

La supervivencia de *Listeria* a pH bajos es altamente dependiente de la temperatura a la que se someta el alimento y de la concentración de sal; baja (de 4% a 6%) aumenta la supervivencia

de la bacteria y superiores al 6% la reducen; la concentración óptima de sal para el crecimiento de *L. monocytogenes* a 10°C, estaría alrededor de un 2 a 2,5%.

Cuando la actividad acuosa (*aw*) es menor a 0.92 provoca su resistencia causada por una protección cruzada, la composición de la membrana de esta bacteria es lo que favorece su crecimiento a temperaturas de refrigeración normalmente 0-8°C, sin embargo el microorganismo crece lentamente (Bell & Kyriankides, 2000; Martí, 2002).

Este microorganismo crece en condiciones bajas de oxígeno y sobrevive por largos periodos de tiempo (Gallagher, 2003), algunos factores nutricionales que favorecen su crecimiento, son la presencia de glucosa, vitaminas del grupo B, aminoácidos tales como valina, cisteína, glutamina, leucina e isoleucina, la influencia de estos factores, son necesarios para el buen desarrollo de las cepas de *L. monocytogenes* (Luna, 2011).

En cuanto a la pérdida de viabilidad de *L. monocytogenes* se logra con el aumento de la presión, de la temperatura y del tiempo, presurizaciones de 137,9 y 206,8 MPa durante 30 minutos a 50°C, reducen las poblaciones bacterianas alrededor de 1 y 2 ciclos logarítmicos respectivamente (Martí, 2002).

L. monocytogenes está ampliamente distribuida en la naturaleza, se adhiere a las superficies que están en contacto con los alimentos formando biopelículas ya que de esta forma, se protege de los desinfectantes y se convierte en un patógeno difícil de controlar en las fábricas de producción de alimentos, siendo posible la contaminación en cualquier etapa de la cadena de producción, convirtiendo a los alimentos en vehículos para llegar al hombre y producir enfermedad, este nivel de patogenicidad y virulencia, se puede conocer a partir de los serotipos pertenecientes a la bacteria, ya que no todos causan alto nivel de daño al ser humano y animales (Roberts & Diezman, 2003; Muñoz et al., 2013).

Esta habilidad de *Listeria* para adherirse a distintas superficies, indica que es una bacteria contaminante muy persistente y peligrosa, las concentraciones de bacterias que se encuentran en una biopelícula están entre 10^4 - 10^7 UFC/cm². La adhesión de *L. monocytogenes* ha sido atribuida a interacciones hidrofóbicas, presencia de flajelos, fibrilas y la síntesis de exopolisacáridos. Es un microorganismo hidrófobo con una energía libre superficial de 66 mJ/m², los flajelos de *Listeria* actúan como estructuras adhesivas durante las primeras etapas

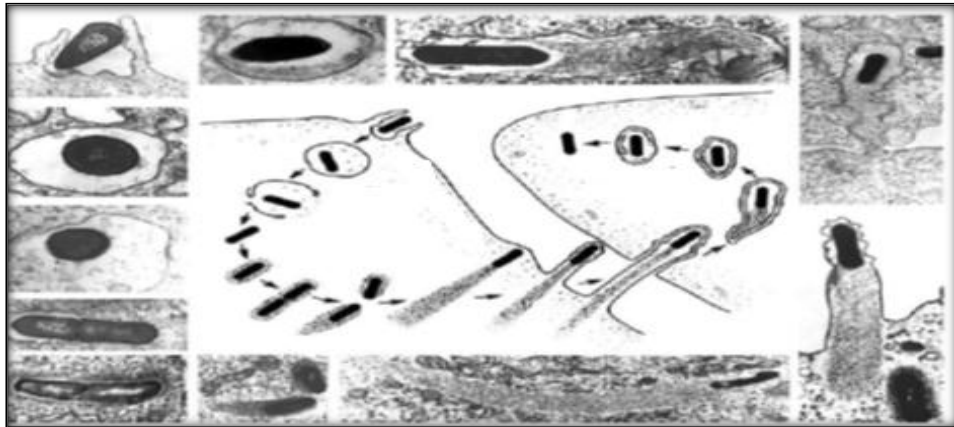
de fijación de la célula. La formación de fibrillas se ha observado a <21 °C y pH de 6.0-9.0, después de 9 horas de incubación en superficies de hierro (Mendoza, 2017).

1.1.1.5 Patogenia y Virulencia

La mayoría de los conocimientos actuales sobre la patogenia y virulencia de *Listeria monocytogenes*, están basados en modelos experimentales de listeriosis en roedores, ya que constituyen un sistema altamente reproducible para caracterizar la virulencia de las especies patógenas del género *Listeria*, mimetizando ciertos aspectos de la infección natural en el hombre y los animales (Howard & Shen, 2007).

Mackanness en 1962, estableció que el sistema mononuclear por fagocitosis atrapaba a las *Listerias* en el hígado y el bazo de los animales infectados, aportando evidencias convincentes de que estas bacterias eran capaces no sólo de sobrevivir sino de multiplicarse activamente (Luna, 2011), este microorganismo intracelular es capaz de invadir y multiplicarse (ver figura 2), dentro de diversos tipos de células del hospedador, en los últimos años se han identificado un gran número de factores de virulencia involucrados en los pasos clave de este ciclo de vida intracelular (Chacón, 2005).

Figura 2. Etapas del ciclo de vida intracelular de *L. monocytogenes*



(Howard & Shen, 2007).

En el intestino, *L. monocytogenes* cruza la barrera de la mucosa, después continúa con la adhesión a la superficie de la célula eucariota y la subsecuente penetración de la bacteria dentro de la célula hospedadora mediante fagocitosis, en el intestino delgado es donde se adhiere e invade las células epiteliales y ocurre una replicación bacteriana además de la

liberación de toxinas inducidas por la presencia de las proteínas en el intestino; el cruce de la barrera epitelial provee a la bacteria con un portal de entrada al sistema linfático y a la sangre (López et al., 2006; Ramírez 2014).

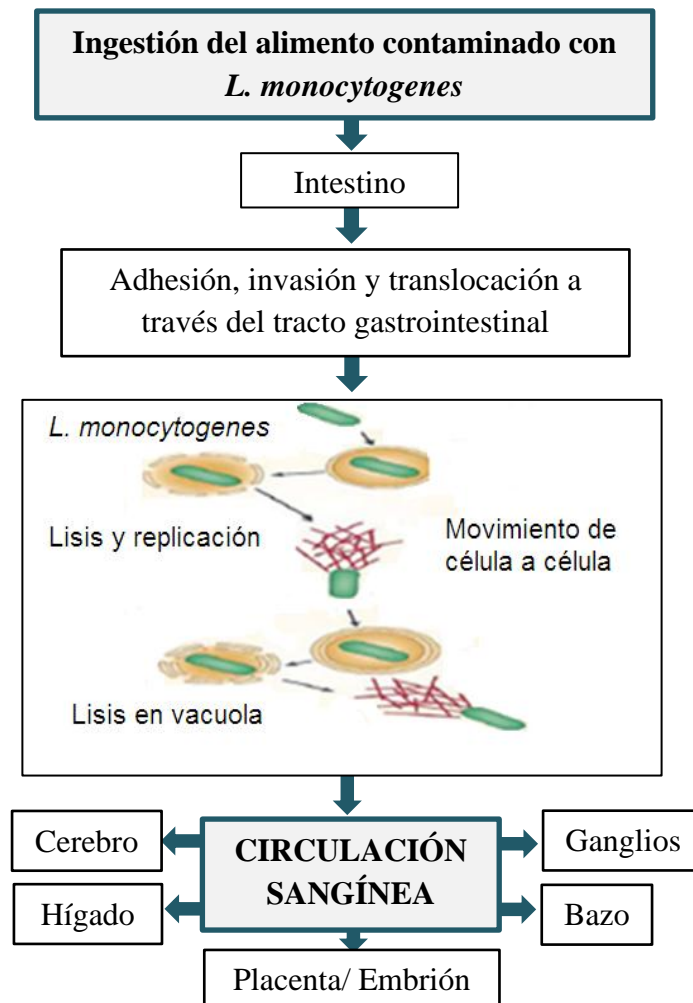
Posteriormente son transportadas por la sangre al hígado y al bazo; siendo estas primeras etapas esencialmente subclínicas, si la respuesta inmune mediada por células del hospedero es inadecuada, las *Listerias* se multiplican en los hepatocitos y en los macrófagos, de esta manera son llevadas por la sangre a varios órganos como son meninges, cerebro y demás órganos (Howard & Shen, 2007).

La infección no está localizada en el sitio de entrada, sino que implica la entrada y multiplicación en una gran variedad de tipos de células y tejidos. Siendo por ello, un proceso multi-etapa en el cual el patógeno primero tiene que cruzar la barrera intestinal, luego establecerse y multiplicarse en órganos primarios y finalmente cruzar dos barreras posteriores, la endotelial particularmente a nivel de cerebro y la materno fetal, para establecerse y multiplicarse en órganos secundarios donde la bacteria causa la enfermedad clínica (Silva 2002; Ramírez 2014).

Una explicación de la virulencia de *Listeria* es la capacidad para moverse en el interior de las células eucariotas y de pasar directamente de una célula a otra sin entrar en contacto con el medio extracelular, quedando por tanto al abrigo de los efectores humorales del sistema inmune (Luna, 2011), la fase prolongada silenciosa inicial es consistente con el periodo de incubación de la enfermedad invasiva, típicamente 20-30 (incluso hasta 70) días después del consumo del alimento contaminado (Ramírez 2014).

A pesar de que existe polimorfismo entre diferentes cepas del microorganismo respecto a algunas determinantes de virulencia, este hecho no puede correlacionarse con la capacidad o la incapacidad del organismo para producir enfermedad (OIE, 2004), *L. monocytogenes* secreta diversas proteínas que son importantes para la virulencia, debido a que los aislados contienen mutaciones en genes fundamentales para estas proteínas asociadas, las cuales representan elementos útiles para los procedimientos de laboratorio que incorporan sustratos en medios de cultivo para evaluar su nivel de virulencia (Torres, 2005).

Figura 3. Mecanismo virulento y patogénico de *L. monocytogenes*.



(Escobedo, 2014; Howard & Shen, 2007).

1.1.1.6 Listeriosis

La listeriosis está considerada como una de las intoxicaciones alimentarias más letales y costosas, la mayoría de los casos requieren hospitalización. Aunque el número de casos de Listeriosis es muy bajo comparado con los de Salmonelosis o Campylobacteriosis, gran parte de los brotes causan mortalidad; *L. monocytogenes* continua siendo un problema de salud pública importante, además produce un impacto en la producción ganadera, que provoca pérdidas de múltiples animales (Silva, 2002).

Globalmente la listeriosis, es una enfermedad esporádica, rara y severa; su prevalencia está declinando en países industrializados, la severidad y proporción de casos fatales de la

enfermedad requiere que su control, sin embargo por las características del organismo es difícil esperar que todos los alimentos estén exentos del patógeno (Ramírez, 2014).

1.1.1.7 Listeriosis humana

Las explicaciones posibles de la emergencia de la listeriosis humana transmitida por el consumo de alimentos contaminados, como un asunto del máximo interés de salud pública comprende los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos, la utilización cada vez mayor de la refrigeración como medio de conservación primaria de los alimentos, los cambios en los hábitos de comida de la población, particularmente respecto a la comodidad de los alimentos ya preparados y un incremento de personas consideradas con alto riesgo de sufrir la enfermedad como embarazadas, recién nacidos, ancianos, inmunodeprimidos o que han sido sometidos a trasplantes de órganos o con enfermedades como diabetes mellitus, cirrosis entre otros casos (OIE, 2004; Escobedo, 2014).

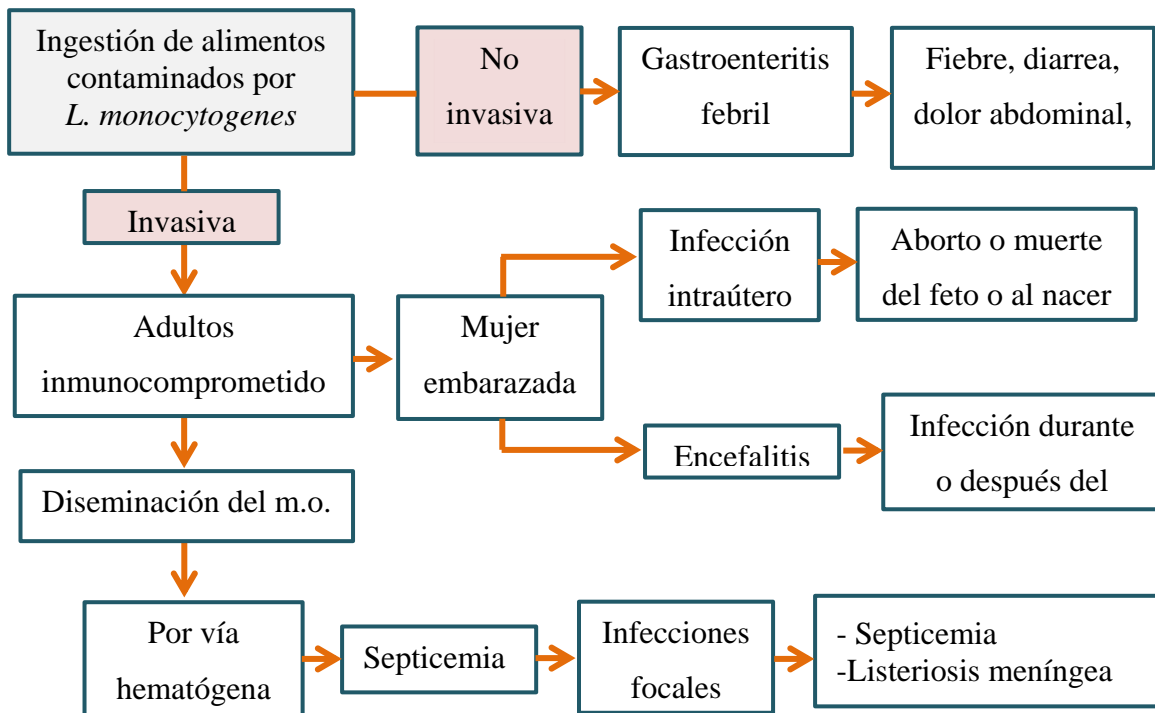
Esta enfermedad es caracterizada por dos síndromes primarios, una forma invasiva de la enfermedad y otra no invasiva (ver figura 4), los síntomas de la listeriosis en personas sanas a menudo son confundidos con los síntomas de la gripe como son fiebre, diarrea, dolor muscular, jaqueca, náusea, vómito y dolor abdominal y la listeriosis invasiva que causa meningitis, encefalitis, septicemia, endocarditis, abscesos, lesiones locales purulentas y abortos (Luna, 2011).

Listeria monocytogenes es un patógeno multisistémico que puede infectar un amplio rango de tejidos hospederos, sin embargo, las principales formas clínicas de listeriosis muestran que este microorganismo posee movimiento hacia el útero grávido, el sistema nervioso central y órganos como bazo e hígado, la infección en el útero o también placentaria es caracterizada por numerosos y pequeños abscesos e inflamación de las vellosidades del útero; la colonización epitelial permite a la bacteria alcanzar la corriente sanguínea fetal, conduciendo a una infección generalizada y la posterior muerte del feto en el útero o la muerte prematura del neonato infectado con lesiones granulares (OIE, 2004), la invasión en el cerebro en humanos y la infección del sistema nervioso central, se presenta en forma de meningitis, la cual está asociada frecuentemente con la presencia de focos infecciosos en el cerebro especialmente en el tallo cerebral (Torres, 2011).

Multiplicación en el hígado: Las células de *Listeria* cruzan la barrera intestinal a través de linfocitos de la sangre hacia los nódulos linfáticos del bazo y el hígado en donde más del 90% de bacterias son acumuladas en este órgano y capturadas por las células de Kupffer que son células propias en el hígado, las cuales inician el desarrollo de la inmunidad anti-*Listeria* induciendo la proliferación de linfocitos y la secreción de algunas proteínas (Gandhi & Chikindas, 2007).

No todas las células bacterianas son destruidas y su número se incrementa en 2 a 5 días en órganos de ratón (Cousens & Wing, 2000). Además, *L. monocytogenes* puede invadir los ojos y la piel por exposición directa, la condición de portador fecal es un factor de riesgo para otros individuos más que para el propio portador, ya que pueden convertirse en enfermos si se presenta un factor desencadenante, por ejemplo gestación, inmunodepresión entre otras (Escobedo, 2014).

Figura 4. Propagación de la listeriosis en humanos



(Howard & Shen, 2007; Silva, 2011).

1.1.1.8 Listeriosis clínica o animal

La listeriosis en los animales está vinculada a la alimentación es decir que cualquier mamífero, además de las aves, puede estar afectado cuando consume algún alimento contaminado con *Listeria*, con certeza el alimento más implicado en la listeriosis de animales es el ensilado, la preparación defectuosa hace que alcance un pH próximo al neutro, en lugar del pH ácido necesario para su conservación (Luna, 2011), permitiendo la rápida proliferación de *Listeria*, consecuentemente, los animales que más consumen este tipo de alimento son aquellos que más sufren listeriosis, los rumiantes en nuestro país principalmente el ganado ovino, seguido del bovino y caprino (Kirvis et al., 2005).

En los animales, las manifestaciones clínicas de la listeriosis incluyen encefalitis, septicemia y aborto, especialmente en ovejas, cabras y vacas; la forma septicémica es relativamente poco común y se produce en el animal recién nacido y se caracteriza por depresión, inapetencia, fiebre y muerte, la forma encefálica se denomina a veces “enfermedad de los círculos” debido a la tendencia que provoca al animal dar vueltas en una dirección, y es la manifestación más común de la enfermedad en los rumiantes, los síntomas comprenden depresión, anorexia, caída de la cabeza o torcimiento de la cabeza hacia un lado, parálisis facial y conjuntivitis (OIE, 2004).

La mucosa intestinal es la vía de entrada principal, después de la ingestión oral, en el caso de una listeriosis septicémica/abortiva, el periodo de incubación puede ser tan corto como de un día, aunque la patogénesis de la listeriosis encefálica está en controversia, parece que los microorganismos pueden entrar en las terminaciones nerviosas a través de abrasiones de la mucosa bucal, los orificios de la nariz, la conjuntiva o los dientes y a continuación, migran centrípetamente hasta causar una infección del sistema nervioso central, el periodo de incubación de la forma encefálica es normalmente de 2 a 3 semanas y el curso de la enfermedad es corto de 1 a 4 días en rumiantes (OIE, 2004).

1.2 Marco jurídico para la prevención y control de la transmisión de *L. monocytogenes* hacia alimentos

El procesamiento de los alimentos en Estados Unidos, la *Food and Drugs Administration* (FDA) y el *United States Department of Agricultural* (USDA) hacen obligatoria la aplicación

del análisis de riesgos y control de puntos críticos (HACCP), en la industria alimentaria; no obstante a nivel de venta, el sistema es voluntario, se señala que para hacer frente al riesgo de la contaminación por *L. monocytogenes* en los alimentos, la industria debe establecer un sistema HACCP con programas de vigilancia para los proveedores, aplicación de buenas prácticas de higiene, control de la temperatura para la conservación del alimento y planes periódicos de monitoreo de *L. monocytogenes* (Carrascal, Albarracín & Sarmiento, 2007).

Si el patógeno se identifica durante este seguimiento, debe realizarse un rastreo microbiológico para determinar la fuente de contaminación que permita prevenir su transmisión, en relación con esto, la Comisión Europea a través del Reglamento 2073/2005, establece dos criterios para el correcto manejo de los alimentos; el primero señala como límite la existencia de 100 UFCg⁻¹ de *L. monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, con vida útil menor o igual a 5 días; el segundo criterio es de cero tolerancia (ausencia en 25 g) en alimentos en los cuales la bacteria puede crecer en condiciones de almacenamiento o cuya vida de anaquel sea mayor a 5 días (OIE, 2004), en Estados Unidos, el criterio es de cero tolerancia en todos los alimentos desde materias primas hasta productos listos para el consumo (Uta-Gasanov, Hughes & Hansbro, 2004).

Los países que contemplan estos criterios, además de las medidas para asegurar la inocuidad alimentaria, exigen el apego de la industria a un marco legal, al sistema HACCP y a procedimientos de detección del patógeno, así como estimular las buenas prácticas para el manejo de alimentos por parte de los consumidores (Castañeda et al., 2014).

En México, las normas oficiales NOM-091-SSA1-1994 y NOM-121-SSA1-1994 establecen cero tolerancia en quesos y leche pasteurizada, mientras que en otros alimentos no se aplica ninguna política, aunque la Norma Oficial Mexicana, NOM-143-SSA1-1995 contempla los procedimientos microbiológicos para la detección de *L. monocytogenes* en los alimentos, no se han implementado, por parte del gobierno ni de la industria alimentaria, leyes o programas que regulen la inocuidad de los alimentos en relación con *L. monocytogenes* (FAO/OMS, 2004).

Por otro lado, la educación de la población para el manejo correcto de los alimentos, que ayude a reducir el riesgo de la infección por la bacteria es nula, por lo que la posibilidad de infección y el desarrollo de la enfermedad es mayor (Carrascal et al., 2007).

La prevención de esta enfermedad en cabras y su posterior transmisión a humanos empieza desde la granja y continúa durante todo el proceso de la elaboración hasta la selección y manipulación de alimentos por el consumidor, la presencia de *L. monocytogenes* es inevitable en el medio agrícola y por esta razón resulta imposible obtener alimentos exentos del microorganismo, sin embargo la implementación de diversas prácticas como: Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), Buenas Prácticas Ganaderas (BPG), Buenas Prácticas de Manufactura (BPM), Procedimientos Operativos Estándar de Saneamiento (POES), así como un HACCP, pueden reducir el riesgo de la enfermedad en animales, granjas, productos y su transmisión hacia alimentos (Díaz et al., 2015).

1.3 Cabras

La cabra fue de las primeras especies en ser domesticadas, debido a su capacidad de adaptación y gran resistencia a ambientes adversos, por su capacidad de ramoneo y por aprovechar la celulosa, que le permite consumir forrajes de muy baja calidad (Jiménez et al., 2013).

En la mayoría de las regiones áridas y semiáridas de África, Asia y América, la cabra representa el principal ingreso económico de los sistemas de producción de pequeños productores de carne, pieles y leche aunque generalmente esta última en pequeñas cantidades. La estrecha relación entre la tierra, la adaptabilidad y los múltiples productos y servicios que las cabras proveen, son componentes fundamentales para comprender el uso sostenido de las diversas razas caprinas y le confiere un estatus funcional desde el punto de vista productivo (Díaz et al., 2015), la producción de leche de cabras manejada por personas inició cuando comenzó la domesticación y por miles de años han sido el sustento de la población particularmente rural (Ramírez, 2007).

1.3.1 Producción de leche

1.3.1.1 Sistemas de producción de caprinos

Los sistemas de producción de leche tienen mayor capacidad de inversión económica, educación formal, y por ende comprensión y uso de la tecnología (Díaz et al., 2015), estos sistemas de producción caprina en el mundo se desarrollan en tres formas:

- a) Extensivos: Este sistema de producción requiere de grandes extensiones de terreno ya que las cabras se alimentan pastoreando a voluntad en forma semi-nómada o sedentaria, presenta la ventaja de reducir costos en alimentación e instalaciones pero generalmente sus rendimientos productivos son menores.
- b) Intensivos: Requieren de instalaciones para una producción estabulada y de la provisión de concentrados alimenticios de gran valor proteico y energético; presenta la desventaja de requerir mayores costos, pero facilita el manejo de los animales y se obtienen mejores índices productivos en producción de carne y leche.
- a) Semi-intensivos: Representa una combinación de los dos anteriores, los animales pastorean y ramonean y en la tarde-noche los animales se estabulan y se les proporciona un suplemento alimenticio, requiere la inversión en instalaciones y alimentos concentrados, generalmente, presenta mejores rendimientos productivos que en el sistema extensivo.

1.3.1.2 Distribución mundial de las cabras lecheras

Asia es líder en cuanto al número de cabras lecheras se refiere, Europa es líder en la producción de leche por cabra, alrededor del 80% de las cabras lecheras de Asia se encuentran en Bangladesh, China, India, Irán, Pakistán y Turquía; en África los países de Argelia, Etiopía, Nigeria, Somalia y Sudan producen cerca del 70% de la leche de cabra, Francia, Grecia y España producen cerca del 75% de la leche de cabra en el continente europeo. Latinoamérica, México y Brasil son los mayores productores en la región Norte y Sudamérica; la tabla 6 muestra la producción de leche de cabra en el mundo (Díaz et al., 2015).

Tabla 6. Producción de leche de cabra a nivel mundial

Región	Producción	Millones de cabezas	Lts por cabra
África	4, 308	71.1	41.6
Norte América	158	0.36	178.7
Sudamérica	216	6.6	32.1
Asia	10, 410	108.1	78.2
Europa	2, 536	9.1	250.7
Total	17, 628		

(Díaz et al., 2015).

La leche de cabra y las granjas caprinas han sido poco evaluadas por mucho tiempo y muy poca especialización ha sido observada hasta finales de los años 50, Asia y Europa son los únicos continentes en donde la leche de cabra tiene una importancia económica alta debido principalmente a la posición conductora e innovadora para la organización y valorización de los productos elaborados con leche de cabra; las principales innovaciones en el manejo de cabras han sido desarrolladas entre la década de los años 60 y 80, algunas de ellas son el ordeño mecánico, control de reproducción, congelación de la leche, controles higiénicos y sanitarios y otras innovaciones en los procesos de elaboración de quesos (Jiménez et al., 2013).

1.3.1.3 Producción de leche caprina en México

En México, la producción caprina se desarrolla en unas 350,000 unidades de producción, con una población cercana a 9 millones de cabezas, que se distribuyen fundamentalmente en cuatro zonas: Árida y Semiárida 39.7%, Centro-Bajío 21.4%, región mixteca 26.4% y zona tropical 12.4% (GECC, 2013).

Los sistemas de producción de leche caprina en América latina comparativamente a los países europeos es bajo y las grandes deficiencias y problemas tecnológicos que los aquejan demandan una urgente asistencia por parte de los gobiernos, en donde México destaca en cuanto a la producción caprina en comparación con los otros países de América Latina, tanto como por el inventario como por el nivel de producción de leche.

La producción de leche de cabra en México, parece ser mucho más grande que la reportada en anteriores estadísticas oficiales, más que cualquier otro animal mamífero de granja, las cabras son el principal proveedor de productos lácteos y cárnicos para la población rural. Por muchas razones la caprinocultura es muy importante, ya que es un complemento para la familia rural de bajo ingreso (Ramírez, 2007); la leche de cabra juega un papel fundamental en regiones del país, particularmente en la comarca lagunera y la región del Bajío, en donde se encuentran asentados los dos principales polos de desarrollo de leche caprina en el país (Díaz et al., 2015).

La mayor parte de los cabritos que se comercializan en México, provienen de razas lecheras, con una aptitud cárnica pobre, de igual forma la mayor parte de las cabras adultas que se comercializan no son de razas especializadas, sino que provienen de cruza de genotipos

criollos con razas lecheras, que han tenido la mayor capacidad de adaptación a ambientes adversos (Jiménez et al., 2013).

En México, el ganado caprino lechero se maneja de dos formas: intensiva y extensiva, el primero está compuesto en su mayoría por cabras de especie Saanen, alpino francés y/o Tuggemburg, con altas producciones de leche, Anglo, Nubia y Granadina, presentando un mosaico de cruzamiento donde los productores han mantenido una mezcla de razas en el que conservan la rusticidad y reproducción de leche aceptable (Díaz et al., 2015).

La producción de leche es una ventana de oportunidad ya que se observa un incremento en el consumo de productos elaborados con leche caprina, por ello el Consejo Mexicano de criadores de ganado caprino (Comecapri) considera la posibilidad que en México se incremente la población caprina debido a diversas causas como son:

- 1) El desarrollo de la caprinocultura en casi 23 Estados de la República.
- 2) A que la inversión inicial para iniciar esta actividad es pequeña.
- 3) A que el ganado es adaptable para zonas con poca disponibilidad de agua y aprovechan forraje no aceptable para otros rumiantes.

Dicho organismo pretende impulsar la producción de alimentos con valor agregado elaborados con leche de cabra como son yogurt, diversos tipos de dulces y helados, así como desarrollar mercados para éstos, además se contempla la posibilidad de exportación de productos como cajeta y quesos a Centro y Sudamérica (Ramírez, 2014).

1.3.2 La leche de cabra

1.3.2.1 Definición y características organolépticas

Se puede definir la leche desde los siguientes puntos de vista:

- **Biológico:** Es la secreción de las hembras de los mamíferos, cuya misión es la de satisfacer los requerimientos nutricionales del recién nacido, en sus primeros meses de vida.
- **Legal:** Se entiende por leche natural el producto íntegro no alterado ni adulterado y sin calostros, proveniente del ordeño higiénico, regular, completo e ininterrumpido de las

hembras mamíferas domésticas sanas y bien alimentadas esta definición se aplica a las leches de vaca, cabra y oveja (Barbera & Ascensión, 2015).

- Técnico: Sistema en equilibrio, constituido por tres sub-sistemas dispersos: solución: (minerales y carbohidratos), emulsión (compuestos grasos) y suspensión (compuestos proteicos), (López et al., 2011).

La leche de cabra debe presentar un color blanco mate; contrariamente a la leche de vaca, la de cabra no contiene betacarotenos, por lo que la mantequilla derivada de la leche de cabra es de color blanco; en cuanto al olor percibido es bastante neutro, aunque a veces al final de la lactancia aparece un olor característico llamado caprónico (Díaz, 2002), particularmente posee un sabor dulzón, agradable; recién ordeñada tiene un sabor neutro; por el contrario, después de haber sido almacenada en frío, adquiere otro sabor muy característico (Barbera & Ascensión, 2015).

En algunos países anglosajones, el sabor de la leche de cabra es un criterio de calidad, ya que su comercialización está muy extendida particularmente utilizando sus derivados como alimentos gourmet, en el caso del queso fino de cabra con un aspecto: aspecto limpio, fluida y sin grumos (Bedoya, Rosero & Posada, 2017).

1.3.2.2 Composición nutricional de la leche de cabra

El conocimiento de los componentes de la leche de cabra es fundamental para el desarrollo de la industria caprina, ya que finalmente de la calidad nutricional que tenga el producto, dependerán en gran medida el rendimiento, la productividad y la aceptación por parte del consumidor (Flores et al., 2009).

La composición de la leche de cabra es diferente a la del ganado ovino, bovino y a la leche humana, puede variar por múltiples factores entre ellos, raza, tipo de alimentación, medio ambiente, sistema productivo, etapa de lactancia e inclusive estado sanitario de los animales; Aun cuando las características y composición de la leche varían, se admiten valores medios o aceptables para considerarla de buena calidad, tales características de la leche de cabra, oveja y vaca se muestran en la tabla 7; con fines de comparación se utiliza la leche de vaca y en ocasiones la de oveja como referencia (Bedoya et al., 2017; López et al., 2011).

Tabla 7. Variaciones en la composición nutricional de la leche de diferentes especies.

Componente	Cabra	Vaca	Humana
Sólidos Totales (%)	12.97	12.01	12.5
Ceniza (%)	0.82	0.7	0.2
Mn ⁺ (mg)	0.018	0.003	0.026
Ca ⁺ (mg)	134	133-132	32
Fe ⁺ (mg)	0.05	0.03-1	3
Mg ⁺ (mg)	14 - 16	11-13	3
P ⁺ (mg)	111	92	14
Na ⁺ (mg)	41 - 50	40 - 60	15 - 17
K ⁺ (mg)	181 - 204	138 - 152	51 - 55
Cu ⁺ (mg)	0.046	0.02	0.04
Yodo (mg)	–	0.021	0.007
Zn ⁺ (mg)	0.3	0.4	0.17
Cloro (mg)	2.2	1.4	0.45
Lípidos, Total (%)	4.14	3.34	3.8 - 4.4
A. grasos saturados (g)	2.67	1.8 - 2.0	2
A. grasos monoinsaturados (g)	1.11	0.96	1.66
A. grasos polinsaturados (g)	0.15	0.12	0.5
Colesterol (mg)	10	10	4
Energía KJ	288	257 - 250	291
Carbohidratos (%)	4.45	4.5 - 4.7	6.89
Lactosa (g)	3.8 - 4.3	4.9 - 5.3	6.98
Vitamina E (mg)	0.07	0.06	0.08
Vitamina D (UI)	12.000	40.431	4
Vitamina K (µg)	0.3	0.2	0.3
β-caroteno (µg)	7	5	7
Ácido ascórbico (mg)	1.1- 2	0	4-5
Tiamina (mg)	0.05	0.04	0.015
Riboflavina (mg)	0.138	0.18	0.036
Niacina (mg)	0.227	0.107	0.177
Vitamina B6 (mg)	0.05	0.04	0.011
Vitamina B12 (µg)	0.06	0.4	0.045
Retinol (µg)	56	28	60
Vitamina A (µg)	56	30	61-64
Proteína total (%)	3.56	3.29	1.03
Caseínas (g)	3.49-2.5	2.8	0.4
Agua (g)	87	87.2 - 88.3	87.43

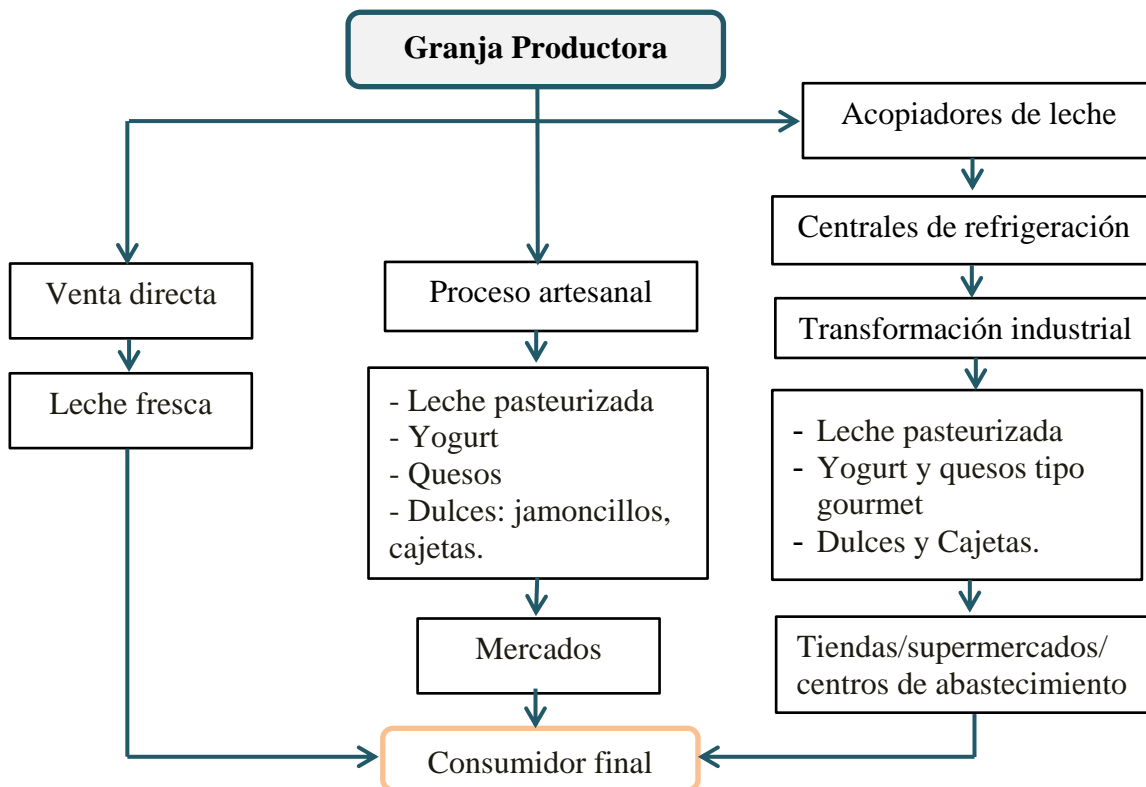
(Chacón, 2005; Bedoya et al., 2017).

1.3.2.3 Leche como materia prima

En México se elaboran principalmente dos tipos de productos a partir de la leche de cabra: quesos y dulces (cajetas, obleas y natillas), en algunos países como Estados Unidos y Brasil se comercializa como leche fluida, yogurts (leches fermentadas), helados y cosméticos (López et al., 2011)

La leche de cabra se convierte en una materia prima que además de tener un costo más bajo de producción, en comparación con otros tipos de leche, posee alto valor nutricional y en lugares donde se elaboran productos tradicionales o artesanales se le atribuyen algunas propiedades curativas, es por ello que los productos elaborados a partir de leche de cabra son altamente consumidos y distribuidos (ver figura 5); el procesamiento de la leche de cabra, puede llegar a ser una oportunidad para mejorar los ingresos de los productores de cabras al dar valor agregado a la producción (Vega et al., 2007; Flores et al., 2009).

Figura 5. Cadena productiva de leche de cabra



(Vega et al., 2007)

1.4 Prevención y control por presencia de *Listeria* en leche de cabra

1.4.1 Bienestar y manejo de las cabras lecheras

Una de las actividades de relevancia en la producción de leche caprina, son las buenas prácticas de manejo de la cabra lechera, que son una serie de medidas que deben realizarse de la manera más adecuada posible, el resultado será obtener una leche de calidad, por tanto es conveniente identificar a la cabra de acuerdo a su etapa de producción, si se encuentra lactando, seca, tratada o con leche anormal (SAGARPA, 2014); algo que es importante evitar para fomentar el bienestar del animal es golpear o estresar a las cabras durante el traslado a la sala de ordeña y durante la ordeña.

El estrés, es una respuesta acumulativa propia de las cabras y su medio ambiente, que tiene como resultado un efecto severo en el comportamiento y en su fisiología, por lo tanto, el medio en el cual habita la cabra lechera debe ser confortable, limpio y seco; la hora de la ordeña debe ser una rutina consistente y la cabra no deberá estar asustada antes de la ordeña, ya que el estrés estimula la liberación de ciertas hormonas (catecolaminas) al torrente sanguíneo e interfieren con la bajada normal de la leche hacia la ubre y pueden reducir la resistencia natural de la cabra a enfermedades que tienden a bajar sus defensas y favorecer el desarrollo de microorganismos patógenos (FAO, 2010; SAGARPA 2014).

Otro componente esencial en el plan de prevención de enfermedades es la vacunación, la vacuna prepara al sistema inmune del animal para responder rápidamente a una subsiguiente infección por microorganismos específicos, normalmente virus y bacterias, también tiende a reducir la diseminación de patógenos causantes de enfermedades, al minimizar el impacto de la infección en la salud del animal, lo que ayudará a mantener su productividad y reducir la necesidad de tratamiento; es importante recordar que las vacunas son solamente herramientas, no son el 100% de prevención, y las enfermedades pueden ser diseminadas debido al estrés, fallas en las prácticas de manejo, alimentación y un ambiente no recomendado (Pedraza, 2011).

1.4.1.1 Alimentación

Muchos hablan de las cabras como animales dañinos ya que comen una gran variedad de vegetales, plantas, hojas y flores, a pesar de ello, estos animales son muy selectivos al momento de elegir qué comer; de todas estas fuentes de alimentación, ellas eligen las partes

más digestibles y nutritivas, ya sea del forraje o de las ramas, esto debido a que necesitan mayor cantidad de nutrientes en relación a su tamaño pequeño y a la alta cantidad de leche que producen (Pedraza, 2011).

Las cabras en lactancia son los animales a los que más hay que alimentar, la cantidad y calidad de alimento individual que se le debe dar a cada cabra depende de la cantidad de leche que produzca (FAO, 2010). Una buena alimentación es el factor primordial para una cabra fuerte, sana y productiva, se sabe que una buena nutrición garantiza entre un 60 y 70% de éxito en la explotación, es por eso que es recomendable cubrir las necesidades nutricionales de los animales dependiendo de su estado fisiológico: cabras gestantes, cabritos, crías en desarrollo, etc., en la tabla 8 se describen los alimentos indicados para las cabras (FAO, 2010).

Tabla 8. Alimentos recomendables para caprinos

ALIMENTO	APORTE
Leguminosas: alfalfa	Proteínas
Pastos secos	Fibra y otros nutrientes
Pastos frescos	Fibra agua y proteínas
Semillas: maíz, avena y trigo	Energía

(Pedraza, 2011).

Teniendo en cuenta el uso final de la leche, el forraje y los piensos destinados a los animales lecheros no deben introducir directa o indirectamente en ella contaminantes en cantidades que entrañen un riesgo inaceptable para la salud de los consumidores o afecten negativamente a la idoneidad de la leche o los productos lácteos. Se ha demostrado que la adquisición, fabricación y manipulación inadecuadas de los piensos pueden dar lugar a que se introduzcan en los animales lecheros agentes patógenos y demás microorganismos que provoquen su descomposición (CAC/RCP, 2004).

Es importante conocer el origen de todos los ingredientes destinados a complementar la alimentación de la cabra, como por ejemplo aditivos, los cuales interactúan con otros componentes alimenticios y el animal además es necesario mantener el alimento destinado para el consumo de las cabras en un lugar limpio y seco, almacenar todos los químicos,

plaguicidas, semillas tratadas, etc., lejos del almacén para evitar que estén en contacto con el alimento (SAGARPA, 2014).

1.4.1.2 Higiene en el agua para consumo en la granja

En cuanto al agua, las cabras necesitan menos consumo de este líquido que las vacas y ovejas, es un factor importante en su alimentación, por lo que es necesario que cuenten con un bebedero en el lugar de pastoreo para que tomen agua fresca y limpia (Pedraza, 2011).

El agua y otros elementos del medio deben gestionarse de tal manera que se reduzca al mínimo la posibilidad de transmisión directa o indirecta de peligros a la leche, el agua contaminada y por ejemplo, las plagas (como insectos y roedores), las sustancias químicas y los ambientes internos y externos donde se alojan y ordeñan los animales, pueden también contaminar los piensos, el equipo o a los animales lecheros. Toda fuente de agua utilizada en las operaciones de producción primaria debe ser apta para el uso al que está destinada y no debe contribuir a la introducción de peligros microbiológicos en la leche (CAC/RCP, 2004).

1.4.2 Higiene del ordeño

El ordeño debe llevarse a cabo de forma que se reduzca al mínimo la contaminación de la leche producida, la utilización de prácticas de higiene eficaces durante el ordeño es un elemento importante del sistema de controles necesarios para producir leche y productos lácteos inocuos e idóneos; se ha constatado que el no aplicar prácticas apropiadas de saneamiento e higiene personal contribuye a la contaminación de la leche por microorganismos indeseables o patógenos, por agentes químicos o físicos peligrosos (FAO 2010).

La leche debe salir por el pezón limpia, libre de impurezas que la contaminen, ya que aunque se filtre y aparentemente se higienice, las bacterias quedan en la leche, reproduciéndose con rapidez, contaminándola, disminuyendo su calidad sanitaria, limitando su vida como alimento, produciendo agriado y reduciendo su tiempo para consumo (también produce malos efectos sobre la producción de quesos); la durabilidad de esa leche dependerá de la cantidad de bacterias y de la temperatura ambiente (Nieto, 2012).

En particular, durante toda operación de ordeño se deberá tener en cuenta la necesidad de reducir al mínimo y/o evitar la contaminación procedente del entorno, y de mantener una

buena higiene personal (CAC/RCP, 2004). La primera salida de leche de cada pezón deberá examinarse para detectar anomalías (PROY NOM-012-ZOO, 1993).

Es importante desarrollar un programa de detección de mastitis y señalar al personal responsable de la ordeña los principales síntomas (ubre rojiza, dura y cuartos calientes), posterior a establecer un sistema de aislamiento al adquirir nuevos animales (cabras o vientres), hasta conocer su estado de salud general; es conveniente realizar una prueba de mastitis para evitar la propagación de dicha enfermedad en el establo (SAGARPA, 2014).

1.4.2.1 Equipo de ordeño y utensilios

El diseño del equipo de ordeño, donde se utilice y los recipientes deben garantizar que no existan grietas ni entradas que puedan interferir con una limpieza apropiada; se sabe que *L. monocytogenes* se adhiere y persiste por largos periodos en numerosas superficies como vidrio, madera, porcelana, hierro, plástico e inclusive en el acero inoxidable, relacionándose directamente con la formación de biopelículas, razón por la que el equipo de ordeño, cisternas y recipientes empleados deben limpiarse y desinfectarse con regularidad y completamente después de cada operación de ordeño y secarse cuando proceda, esto para reducir al mínimo o evitar la contaminación del patógeno a la leche (CAC/RCP, 2004).

Debe existir un proceso de verificación periódica para cerciorarse de que el equipo de ordeño se mantiene en buenas condiciones de funcionamiento, el equipo y los utensilios destinados a entrar en contacto con la leche como son recipientes, cisternas, entre otros, deben ser fáciles de limpiar y desinfectar, resistentes a la corrosión e incapaces de transferir sustancias extrañas a la leche en cantidades que entrañen un riesgo para la salud del consumidor (FAO, 2010). La contaminación de la leche con detergentes y sanitizantes, permitidos se debe evitar utilizando productos adecuados y siguiendo las instrucciones de uso del fabricante (PROY NOM-012-ZOO, 1994).

1.4.3 Instalaciones

Las instalaciones cerradas o para el alojamiento de las cabras lecheras deben encontrarse en condiciones limpias, secas y sobretodo satisfacer el bienestar y salud de los animales los pasillos, superficies de los pisos, altura de las salas de ordeña y el sistema de drenaje, no deben causar daño al animal y deben ser de fácil mantenimiento, deben estar adecuadamente

ventiladas y no expuestas a corrientes de aire; los comederos usados para ofrecer el forraje, concentrado y agua, deben estar contruidos y localizados de tal manera que el alimento no sea desperdiciado o contaminado (SAGARPA, 2014).

En cuanto a las instalaciones abiertas se debe asegurar que los pasillos sean lo suficientemente amplios para permitir el acceso de los animales, no debe haber grietas o agujeros en los pisos, ni pasillos con obstáculos o salientes, ya que estos provocan heridas y golpes y esto es muy peligroso ya que la mayoría de patógenos encuentran condiciones adecuadas para incidir al animal; la mala ventilación concentra el polvo, malos olores y microorganismos en el ambiente; además elevan la temperatura, favoreciendo así la aparición de diversas enfermedades. Construir establos con buena ventilación contribuye a que recircule el aire adecuadamente y mantenga las condiciones de temperatura adecuadas en la granja (FAO, 2010).

1.4.3.1 Mantenimiento y limpieza de instalaciones

Las instalaciones, deberán mantenerse tan secas como sea posible ya que el uso de métodos de limpieza en seco y la limitación del empleo de agua en las zonas de elaboración ayuda a evitar la difusión de contaminación a través del agua, se ha constatado que la limpieza en húmedo, da lugar a la contaminación de los productos lácteos debido a la producción de aerosoles. Deben limpiarse adecuadamente todas las superficies de las tuberías y equipos que entran en contacto con los productos, incluidas las zonas difíciles de limpiar, tales como válvulas de desviación, válvulas de muestreo y los sifones de desagüe de las llenadoras (CAC/RCP, 2004; FAO 2010).

En el caso de las granjas abiertas se debe de hacer énfasis en el orden y la limpieza y desinfección constante de la granja, ya que los animales deben de estar exentos de cualquier tipo de contaminante, las heces deben limpiarse constantemente para evitar que los animales las propaguen y si tienen alguna enfermedad infecciosa ya sea Listeriosis o alguna otra, no se disemine al ambiente por efecto de las corrientes de aire. Se debe establecer un programa regular para verificar si la limpieza es adecuada, siempre que sea necesario, todos los equipos y utensilios usados deberán limpiarse y desinfectarse, enjuagarse con agua potable (a menos que las instrucciones del fabricante indiquen que el enjuague no sea necesario), escurrirse y secarse (CAC/RCP, 2004)

1.4.4 Manejo e inocuidad de la leche

1.4.4.1 Almacenamiento

El elevado contenido de agua, pH cercano al neutro y una gran variedad de nutrientes disponibles, hacen de la leche sea un producto altamente perecedero y posea excelentes condiciones para que *Listeria monocytogenes* y cualquier otro microorganismo se desarrolle; la leche cruda debe ser enfriada dentro de las 3.5 horas del inicio de la ordeña a una temperatura que no exceda 5°C y protegida de la luz (SAGARPA, 2014).

Debido a que *L. monocytogenes* es un microorganismo que puede desarrollarse de manera lenta bajo esas condiciones de temperatura se deben desarrollar medidas exhaustas, si se sospecha la presencia de listeriosis en la cabra, ese animal debe someterse a tratamiento y su leche no será apta para el consumo. Si no es detectado el problema a tiempo, el almacenamiento en frío de la leche solamente contribuirá a la propagación del microorganismo puede desarrollarse a bajas temperaturas y contaminar tanto al manipulador como a los equipos donde se almacena la leche, ya que es formadora de biopelículas y estas se pueden adherir en las orillas de un tanque o recipiente (Becerra, 2013).

Después de la detección de leche contaminada por listeriosis se debe desarrollar un plan de emergencia para el resto de la leche proveniente de cabras sanas, cuando se presente un evento como:

- La leche no ha sido enfriada correctamente o almacenada.
- La leche presentó contacto con superficies sucias (CAC/RCP, 2004).

Además las buenas prácticas del manejo de la leche deberán incluir:

- La leche no debe ser almacenada por más de 48 horas.
- Revisar la temperatura del tanque frío después de cada ordeña.
- Inspeccionar la limpieza del tanque frío semanalmente y cuando se carezca de un tanque frío, los recipientes con leche pueden ser enfriados en agua con hielo, (SAGARPA, 2014).

Las temperaturas diferentes de las mencionadas pueden ser aceptables si tales desviaciones no determinan un riesgo mayor de peligros microbiológicos y han sido aceptadas por el que

recibe la leche, las ha aprobado la autoridad competente y el producto final cumplirá de todos modos los criterios microbiológicos establecidos en la legislación vigente (CAC/RCP, 2004).

1.4.4.2 Equipo e instalaciones para el almacenamiento de la leche

El diseño, la construcción, el mantenimiento y la utilización de las cisternas y los recipientes de almacenamiento de la leche deben llevarse a cabo de manera que se evite la introducción de contaminantes en la leche y se reduzca al mínimo la proliferación de *L. monocytogenes* en ella. Los locales y condiciones de almacenamiento de la leche y los equipos relacionados con el ordeño y la ubicación, el diseño, la construcción, el mantenimiento y la utilización de las instalaciones para el almacenamiento de la leche, así como del equipo relacionado con el ordeño, deben ser tales que se evite la introducción de contaminantes en la leche (CAC/RCP, 2004).

1.4.4.3 Controles del tiempo y la temperatura

Desde la producción de leche hasta los productos finales, todos los productos deberán almacenarse a la temperatura apropiada y por el tiempo adecuado a fin de reducir al mínimo el crecimiento o desarrollo de peligros para la inocuidad alimentaria y evitar efectos negativos para la idoneidad de los alimentos en cuestión ya que la leche y los productos lácteos poseen un contenido de humedad suficiente para la proliferación de agentes patógenos, el control del tiempo y la temperatura (CAC/RCP, 2004).

Se constituye una medida de control microbiológico fundamental para combatir tal proliferación durante todo el proceso de elaboración, desde la manipulación de la leche hasta la distribución y almacenamiento de los productos lácteos perecederos (tales como leche pasteurizada para consumo, los postres y los quesos blandos, dependiendo de su tiempo de conservación). Por ejemplo, en el caso de la leche líquida una temperatura alta (mayor a 10°C) durante el almacenamiento reducirá su tiempo de conservación (FAO, 2010; (CAC/RCP, 2004).

Cuando la leche de cabra sirve como materia prima destinada a elaboración de algún producto derivado, no se recoge ni utiliza dentro de las dos horas que siguen al ordeño, la misma deberá enfriarse a una temperatura igual o inferior a 6°C si se recoge diariamente o a una temperatura igual o inferior a 4°C si no se recoge diariamente (FAO, 2010).

1.4.5 Personal de la granja

Debe asegurarse que todo el personal que labora en el establo pueda demostrar la capacidad, habilidades y conocimiento en inocuidad alimenticia; las prácticas de higiene personal tienen como principal objetivo crear conciencia de la importancia de evitar el riesgo de contaminación de la leche, y comprenden las reglas de higiene del personal en cada una de las áreas del establo, las que serán colocadas a la vista de todo el personal que labora en la granja, para que tengan siempre presente las medidas que deben de tomar (SAGARPA, 2014).

El personal encargado de la sala de ordeña y en toda la granja tendrá que conocer y ser capacitado en prácticas manejo higiénico de la ordeña, es fundamental establecer programas de higiene del personal, mediante el uso de equipo de protección necesario para evitar la contaminación de los productos alimenticios e implementar un plan de capacitación en la detección de listeriosis, que servirá para ayudar con el tratamiento y prevención de mastitis y otras enfermedades producidas en la cabra y la protección del personal como tal (FAO, 2010).

1.4.6 Control de los peligros alimentarios

La combinación de medidas de control debe permitir un control eficaz de los peligros identificados en la leche y los productos lácteos, que deberán adaptarse a las condiciones higiénicas de la leche y las materias primas empleadas, teniendo en cuenta los riesgos microbiológicos, causados por la presencia de un patógeno en una granja. Para controlar el peligro de esta incidencia es necesario escoger las medidas de control y/o combinaciones de medidas apropiadas para los peligros relativamente probables, y se aplicarán las disposiciones sanitarias descritas en la NOM-091-SSA1, a fin de reducir al mínimo o evitar la probabilidad de un riesgo para la salud del consumidor (FAO, 2010; NOM-091-SSA1, 1994).

1.4.6.1 Identificación y evaluación de peligros

Deben identificarse todos los riesgos posibles antes de escoger las medidas de control, ya que constituyen el primer paso del análisis de peligros, la identificación debe basarse en las descripciones iniciales elaboradas en etapas preliminares y en la experiencia, así como en información externa, datos epidemiológicos y otros datos históricos vinculados con el tipo del alimento a estudio, materias primas e ingredientes utilizados y aquellos que pueden introducirse durante la elaboración y distribución. Para garantizar un enfoque global deben identificarse la etapa o etapas del proceso de elaboración, desde la selección de los materiales

hasta la elaboración y distribución, en las que puede presentarse o introducirse un riesgo de incidencia del patógeno al alimento (CAC/RCP, 2004).

Después de evaluar cada peligro potencial se debe determinar la gravedad de la listeriosis y sus efectos nocivos para la salud y la probabilidad razonable de su presencia; cuando se determinen que tienen graves consecuencias para la salud pública o que existen mediante probabilidades razonables de los posibles peligros se deberían controlar mediante el sistema de medidas de control y buscar acciones para prevenir el problema (FAO, 2010).

1.4.6.2 Selección de las medidas de control

Después de la evaluación de peligros, se deberán seleccionar las medidas de control y las combinaciones de éstas que prevengan, eliminen o reduzcan los peligros a niveles aceptables. El siguiente paso en el proceso de análisis de peligros es escoger las medidas de control que resultarán eficaces para controlarlos, posteriormente deben aplicarse criterios sobre cierta actividad, para las medidas de control a fin de que tal proceso se aplique de una manera que responda al rendimiento requerido, es decir, que garantice la aplicación adecuada de la medida de control, los criterios deben establecerse en intensidades que aseguren el rendimiento esperado de las medidas de control, tomando en cuenta las desviaciones normales del proceso (CAC/RCP, 2004).

CAPÍTULO 2. METODOLOGÍA

2.1 Objetivos

2.1.1 General

Detectar la presencia de *Listeria monocytogenes* en leche de cabra proveniente de granjas productoras, por medio de su aislamiento microbiológico e identificación de la especie con pruebas bioquímicas y cromogénicas, para la propuesta de un plan de prevención y control de riesgos de contaminación a nivel de la granja.

2.1.2 Particulares

- I. Aislar la bacteria *Listeria* en muestras de leche de cabra mediante la metodología descrita en la Norma Internacional ISO-11290-I: 1996, para la detección de las granjas contaminadas.
- II. Identificar las cepas aisladas sospechosas mediante pruebas bioquímicas y el uso de un medio cromogénico específico, para la confirmación de *Listeria monocytogenes*.
- III. Proponer un plan de prevención y control en granjas caprinas, para reducir el riesgo de contaminación por *Listeria monocytogenes* detectada en la leche de cabra, basándose en la normatividad vigente.

2.2 Materiales y métodos

2.2.1 La muestra

Se estudiaron 61 muestras de leche, cada una proveniente de una cabra distinta; estas muestras se recolectaron de siete diferentes granjas productoras de leche en las regiones centro y norte del Estado de Chiapas. Para realizar las pruebas microbiológicas se hicieron mezclas (M), de aproximadamente 3 muestras de leche por granja, según se describe en la siguiente tabla.

Tabla 9. Distribución de las muestras de leche de cabra

MUESTRA	GRANJA	REGIÓN	MUNICIPIO	MEZCLA
165-167	EP	Centro	Ocozocuatla	M1
168-170	EP	Centro	Ocozocuatla	M2
171-173	EP	Centro	Ocozocuatla	M3

174-176	EP	Centro	Ocozocuautila	M4
177-179	EP	Centro	Ocozocuautila	M5
180-182	EP	Centro	Ocozocuautila	M6
183-185	EP	Centro	Ocozocuautila	M7
185,186	RM	Centro	Ocozocuautila	M8
187-189	LL	Centro	Ocozocuautila	M9
190-192	LL	Centro	Ocozocuautila	M10
193-196	LL	Centro	Ocozocuautila	M11
198-200	SB	Norte	Reforma	M12
201-203	SB	Norte	Reforma	M13
204-206	SB	Norte	Reforma	M14
207-209	DP	Norte	Rayón	M15
210-212	LN	Norte	Pijjiapan	M16
213-215	LN	Norte	Pijjiapan	M17
216-219	LN	Norte	Pijjiapan	M18
220-222	LO	Norte	Villa Corzo	M19
223,224	LO	Norte	Villa Corzo	M20
225,226	LO	Norte	Villa Corzo	M21

2.2.1.1 Reactivación de la posible presencia de *Listeria* en agua peptonada

Cada una de las muestras se recibió en tubos, debidamente identificados y cerrados, los cuales se mantuvieron en congelación a una temperatura de -7°C .

Para el análisis se descongelaron las muestras de leche de cabra por medio de refrigeración a temperatura de 7°C y posteriormente se realizaron las mezclas (M) de las diferentes leches. Se reactivaron las posibles *Listerias* presentes en cada una de las muestras de leche de cabra por medio de un “primer pre-enriquecimiento no selectivo”, con agua peptonada ya que es muy probable que se encontraran estresadas y/o dañadas por la congelación durante el tiempo de almacenamiento (NOM-114-SSA1-1994).

2.2.2 Aislamiento microbiológico

Se empleó el procedimiento que indica la norma ISO 11290-1 para la detección cualitativa de *Listeria* (Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales: método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes* - parte I, 1996), en las muestras de leche de cabra de las siete granjas productoras, basado en el preenriquecimiento y enriquecimiento selectivo de la muestra que permitirá restaurar las células de *Listeria* dañadas, a una condición fisiológica estable (NOM-114-SSA1-1994).

Los medios utilizados para este paso fueron caldo Selectivo Diferencial Demi Fraser y el Caldo Fraser ambos con un suplemento de citrato férrico de amonio; todas las especies de *Listeria* hidrolizan la esculina contenida en los medios, provocando un oscurecimiento del caldo debido a la formación de un compuesto llamado 6,7-dihidroxicumarina, que reacciona con los iones férricos del suplemento (DIFCO & BBL, 2009).

▪ Caldos Selectivos y diferenciales

En base a la metodología descrita en la norma (ISO 11290-1, 1996), se utilizaron 225 mL de caldo Demi Fraser y 10 mL de caldo selectivo Fraser, además de un suplemento de Citrato férrico de amonio al 0.05%.

Debido a que esta solución no se puede someter a esterilización en autoclave, se hizo pasar por un filtro de acetato de celulosa con un poro de 0.25 micrones y el filtrado se guardó en un frasco color ámbar y se almacenó a una temperatura de 7°C, hasta su inoculación.

▪ Medio selectivo y diferencial Oxford modificado

El aislamiento microbiológico se realizó en placas de medio de cultivo selectivo-diferencial, Oxford modificado con un suplemento específico para *Listeria* constituido por antibióticos como sulfato de colistina y moxalactam que actúan como inhibidores del crecimiento de levaduras u otros organismos que puedan interferir en su desarrollo (Escobedo, 2014). Aquellas colonias con morfología característica de *Listeria spp.*, redonda, café oscuras (hidrólisis de esculina positiva), con centro negro, se sembraron en agar Tripticaseína de Soya (TSA), para su posterior purificación (NOM-143-SSA1-1995).

Se prepararon placas de medio Oxford modificado, previamente se ajustó a un pH de 7.2 ± 0.2 y se llevó a esterilización a 121°C por 15 minutos, dejándolo enfriar a temperatura de 45-50°C

y se adicionó el contenido del vial del antibiótico, fórmula 10/1000 mL, en condiciones asépticas, para verterlo después en cajas Petri estériles.

▪ Medio nutritivo TSA

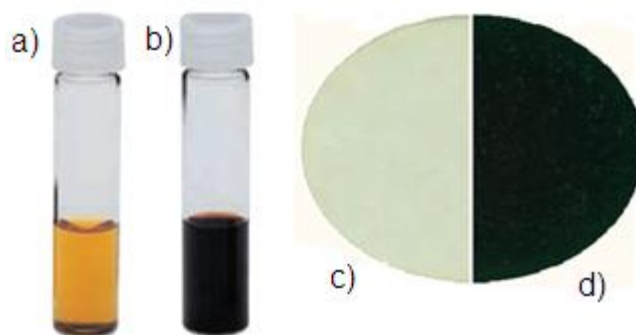
Se preparó el medio TSA de acuerdo a las cantidades que establece el fabricante, de igual manera fue necesario ajustar el pH adicionando gotas de NaOH al 10% y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, después de dejar enfriar el medio a 45-50°C se vertió a cajas Petri estériles en condiciones asépticas.

2.2.2.1 Siembra, aislamiento y purificación de cepas sospechosas

Se tomaron 25 mL de la muestra de leche de cabra con agua peptonada (NOM-114-SSA1, 1994) y se agregaron a un matraz con 225 mL del caldo Demi Fraser para su segundo preenriquecimiento más 2.5 mL del suplemento de citrato férrico de amonio. Se incubó a 37°C por 24 horas. El caldo se podrá tornar de amarillo a negro (ver figura 6), si hay posible presencia de *Listerias* (DIFCO & BBL, 2009).

Pasado el tiempo de incubación, se tomó 1 mL del agua peptonada y se transfirió a un tubo con 10 mL de caldo Fraser más 0.1 mL de citrato férrico de amonio, incubando a 30°C por 48 horas; pasado el tiempo de incubación, con ayuda de una asa y en condiciones de esterilidad se tomó un poco del caldo y se sembró por estría en una placa del medio Oxford y se incubó a 30°C por 24 horas.

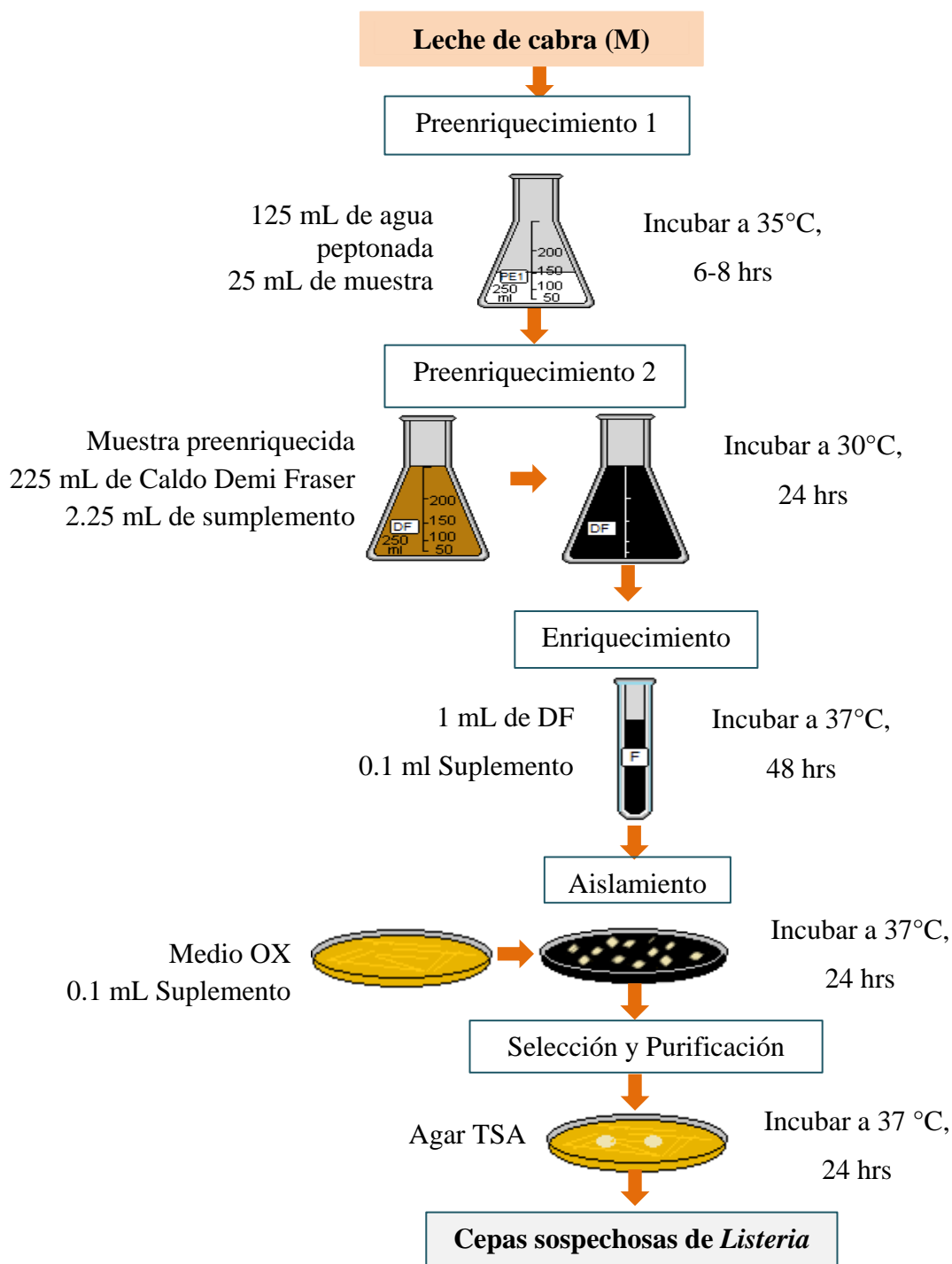
Figura 6. Caldo Demi Fraser y ejemplo de placa con medio Oxford en presencia de *Listeria*



- a) Tubo sin inóculo; b) tubo con inóculo de *L. monocytogenes* ATCC 19114; c) Placa sin siembra; d) placa con cepa de *L. monocytogenes* ATCC 19114. (DIFCO & BBL, 2009).

Las colonias típicas en este medio se observan muy pequeñas, redondas, café oscuro (hidrólisis de esculina positiva), con centro negro (NOM-143-SSA1, 1995), a estas colonias “sospechosas” que tuvieron estas características se les aislaron y purificaron por siembra en placas de medio TSA a una temperatura de 37°C por 24 horas

Figura 7. Procedimiento general para el aislamiento microbiológico de *Listeria*



2.2.3. Identificación mediante pruebas bioquímicas para el género *Listeria* y la especie *L. monocytogenes*

Las colonias presuntivas que se aislaron de los medios selectivos/diferenciales, pueden identificarse como *Listeria monocytogenes* después de caracterizarlas bioquímicamente para confirmar que corresponden a este género; se realizaron una serie de pruebas bioquímicas básicas como Tinción de Gram y su confirmación con el reactivo KOH, y las pruebas básicas Catalasa y Oxidasa; debido a que *Listeria* tiene características morfológicas similares a otros géneros como *Corynebacterium* y *Erysipelothrix* es necesario realizar algunas otras pruebas bioquímicas para diferenciarlas entre sí, teniendo cuidado de utilizar cepas con un tiempo no mayor de 24 horas desde su crecimiento, dado que se pueden obtener resultados falsos negativos (Mac Faddin, 2003; Escobedo, 2014).

2.2.3.1 Tinción de Gram

La tinción de Gram es usada para clasificar bacterias sobre la base de sus morfologías celulares (cocos, bacilos y cocobacilos) y la reacción de coloración diferencial de Gram (color) (Koneman & Allen, 2008).

Se preparó un frotis para tinción de un cultivo de 18 a 24 horas de crecimiento de las colonias, se fijó al calor y se dejó enfriar para añadir después una gota de solución de cristal violeta y retirar después de 30 segundos mediante un lavado con agua; se agregó solución de lugol y se decantó transcurridos 30 segundos, el frotis fue decolorado con alcohol-acetona durante 3 segundos y después lavado con agua para ponerse en contacto 30 segundos con el colorante de contraste (safranina), el cual fue retirado por lavado con agua y se dejó secar (Álvarez & Mendoza, 2005).

Se examinó el frotis teñido, en el microscopio bajo el objetivo de inmersión a 100x, para identificar su morfología agregando antes unas gotas de aceite de inmersión; las bacterias Gram positivas se tiñen de color azul oscuro; las bacterias Gram negativas se visualizan de color rosa o rojo.

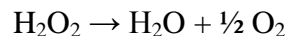
2.2.3.2 Confirmación del Gram con KOH

Esta técnica confirma el Gram positivo (G+) o negativo (G-) en virtud de la pared celular al reaccionar con una solución alcalina diluida de Hidróxido de potasio (KOH) al 3% (Escobedo, 2014).

En un portaobjetos se puso una gota de KOH y una asada del cultivo puro reciente con menos de 24 horas de crecimiento, se mezcló durante unos segundos y se levantó muy ligeramente el asa. Si se forma de un hilo, la reacción se considera positiva, esto significa que la bacteria pertenece al grupo de bacterias G-, mientras que las bacterias que no se aglutinaron, se consideraron como G+ (Koneman & Allen, 2008); en este caso *Listeria* es Gram positiva y no se aglutina en el portaobjetos, al adicionar el KOH.

2.2.3.3 Prueba de Catalasa

La enzima catalasa interviene en la degradación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en oxígeno y agua; la presencia de la enzima en un aislamiento bacteriano se evidencia cuando se pone en contacto una colonia de la bacteria con una gota de H₂O₂, debido a que éste un compuesto muy oxidante, las bacterias liberan esta enzima provocando la descomposición del H₂O₂ en agua y la formación rápida de burbujas de oxígeno (Ramírez, 2007).



Para esta técnica se agregaron unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos y tomando con un palillo un poco de la colonia sospechosa la cual no debía tener un tiempo de crecimiento mayor a 24 horas; se mezcló con el peróxido y se observó la reacción durante 20-30 segundos; la prueba se considera como positiva si se observa una formación de burbujas que corresponden a la generación de oxígeno debido a la presencia de la enzima (Ramírez, 2007).

2.2.3.4 Prueba de Oxidasa

Esta prueba se hizo para demostrar la presencia de citocromo oxidasa bacteriana una enzima que oxida el citocromo C de la cadena transportadora de e-, mediante el empleo de la oxidación del sustrato conocido como dihidroclorhidrato-tetrametil-pfenilendiamina a

indofenol, como producto final, para *Listeria* deberá observarse un cambio de color a púrpura oscuro (Forbes, Sahm & Weissfeld, 2004).

Se colocó sobre un papel filtro 3 gotas de dihidroclorhidrato-tetrametil-pfenilendiamina y con un palillo se extendió la colonia de la bacteria sobre el papel impregnado, transcurridos 30 segundos, se observó si ocurrió algún cambio de color. La prueba es positiva cuando toma un color púrpura la muestra.

2.2.3.5 Prueba de OF (Oxidación-Fermentación)

Las bacterias utilizan los carbohidratos por dos procesos: oxidación y fermentación, algunas bacterias son capaces de metabolizar un carbohidrato (manifestada por la producción de ácido), solo en condiciones aeróbicas; otras producen ácido tanto en condiciones aeróbicas como en anaeróbicas; la fermentación es un proceso anaeróbico y los fermentadores bacterianos de un carbohidrato son por lo general anaerobios facultativos.

El medio utilizado para esta prueba es el OF Hugh y Leifson, el cual contiene una gran cantidad de carbohidratos y baja concentración de peptona, para evitar que un microorganismo aerobio utilice la peptona y produzca así condiciones alcalinas que neutralizan la más ligera acidez producida por un organismo oxidativo (Álvarez & Mendoza, 2005).

El medio que se utilizo es el OF con glucosa al 1%, se inocularon por picadura un poco de la cepa sospechosa en dos tubos, uno abierto: sin glicerol y uno cerrado: con glicerol, se llevó a incubación a 35°C durante 48 horas y se observaron los resultados.

2.2.3.6 Prueba de Voges-Proskauer (VP)

El ácido pirúvico formado durante la degradación fermentativa de la glucosa es metabolizado por diferentes vías, produciendo grandes cantidades de ácido, a partir del carbohidrato empleado como sustrato (Álvarez & Mendoza, 2005). La prueba ayudó para la diferenciación de especies; las que producen ácidos mixtos en el caso de *L. monocytogenes* de otras especies que no, como *Corynebacterium* y otras, para observar la reacción se adiciona un reactivo indicador llamado α -naftol en etanol al 5% (Mac Faddin, 2003).

Se inoculó un tubo de caldo RM/VP con el cultivo puro de crecimiento menor a 24 horas, y se añadieron 0.6 mL de α -naftol al 5% y 0.2 mL de KOH al 40%. Es importante adicionar los

reactivos en ese orden, agitando el tubo cuidadosamente para exponer el medio al oxígeno atmosférico y dejarlo reposar de 10 a 15 minutos; una prueba positiva está indicada por el desarrollo de un color rojo en la superficie del medio (Álvarez & Mendoza, 2005).

2.2.3.7 Prueba de Ureasa

La ureasa es una importante enzima microbiana relacionada con la descomposición de los compuestos orgánicos, hay dos tipos de enzimas constitutivas o adaptativas; la ureasa es considerada constitutiva debido a que es sintetizada por ciertas bacterias sin tomar en consideración la presencia o la ausencia de un sustrato, la urea.

La prueba consiste en determinar la capacidad de un microorganismo de hidrolizarla en dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa, con la resultante alcalinidad. Para el caso del género *Listeria*, la prueba es negativa es decir, el indicador que contiene el caldo (rojo fenol), deberá quedar de color rosado-rojo (Mac Faddin, 2003).

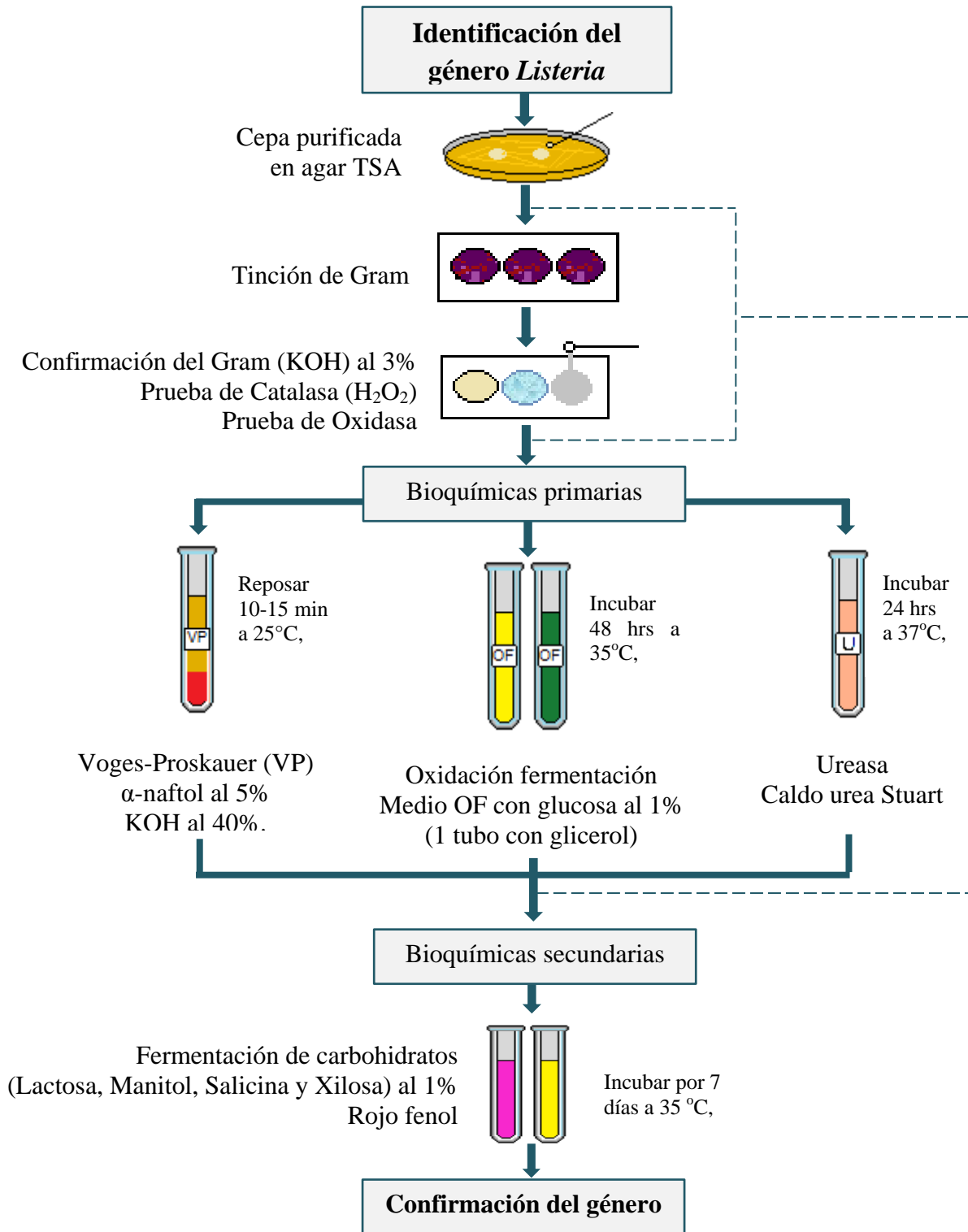
Se utilizó el caldo urea de Stuart y se esterilizó por filtración en filtro de acetato de celulosa con un poro de 0.22 micrones, después se tomó una asada de cada una de las cepas sospechosas y se inoculó en el caldo, se incubó a 37°C durante 24 horas.

2.2.3.8 Pruebas de fermentación de carbohidratos

Determinan la capacidad de un microorganismo para fermentar u oxidar (degradar) un hidrato de carbono específico incorporado en un medio basal y producir ácido o ácido con gas visible, las bacterias que fermentan un hidrato de carbono por lo común son anaerobias facultativas como es el caso de *Listeria* (Mac Faddin, 2003).

Se inocularon cada uno tubos con las cepas sospechosas de *Listeria* para identificar sus especies, cada tubo contenía 2 mL de caldo rojo fenol con los carbohidratos: manitol, lactosa y xilosa al 5% y Salicina al 1%, incubando los tubos a 35°C en aerobiosis hasta 7 días, se observó el vire del indicador a una coloración amarilla para una prueba positiva o producción de ácido y rosa si es negativa (NOM-143-SSA1, 1995).

Figura 8. Procedimiento general para la identificación del género *Listeria* y sus especies (NOM-143-SSA1, 1995; Mac Faddin, 2003; Forbes et al, 2004; Álvarez & Mendoza, 2005).



2.2.4 Confirmación de la especie: Prueba con medio cromogénico específico para *Listerias*: BBL™ CHROMagar™ *Listeria*

Esta prueba utiliza un medio específico utilizado para la confirmación de la especie *L. monocytogenes* ya que la diferencia de *L. innocua* la especie más parecida en cuanto a características bioquímicas. Este es un método rápido utilizado para comprobar las especies de diferentes microorganismos patógenos; se denomina medio “cromogénico” debido a que contiene una mezcla de cromógenos elaborados a partir de sustratos artificiales que liberan compuestos que al ser degradados por enzimas microbianas específicas, que garantizan la diferenciación visual de ciertas especies microbianas (CHROMagar™, 2016).

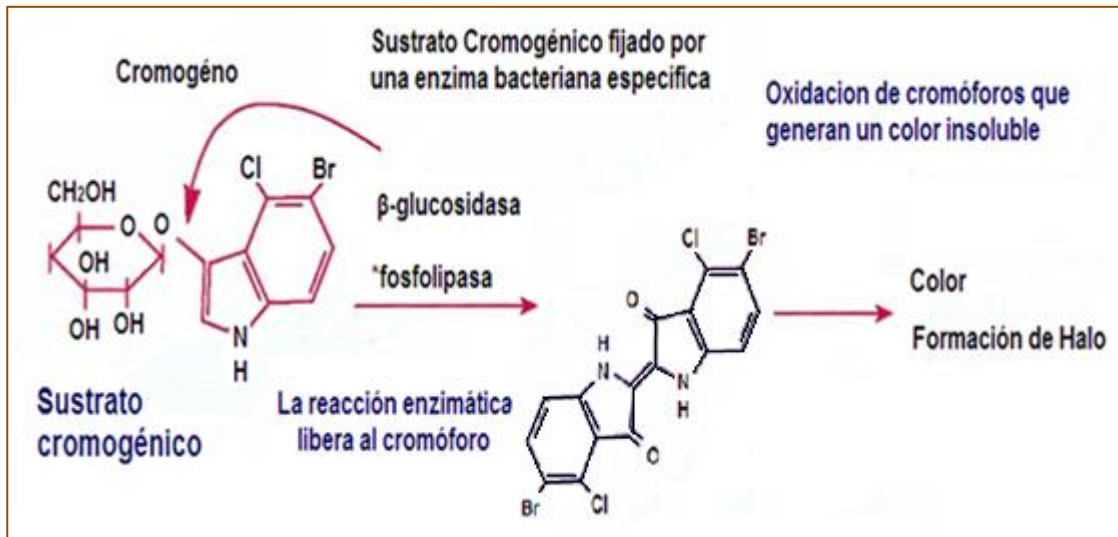
CHROMagar™ *Listeria* reacciona de dos formas, la primera es expresada por medio de una coloración rosa de las colonias generadas por una reacción enzimática producida solo por dos especies: *L. monocytogenes* y *L. innocua* y el cromógeno contenido en el medio de cultivo; la segunda reacción se lleva a cabo por sustratos fosfolípidicos como la fosfolipasa C fosfatidilinositol (PI-PLC) y C-fosfatidil-colina fosfolipasa (PC-PLC), (ver figura 9), producidas por *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* las cuales intervienen en el proceso de virulencia, generando la formación de un “halo” blanco alrededor de la colonia (AFNOR CHROMagar™ *Listeria*, 2009), es por ello que este método permite diferenciar y comprobar de manera efectiva las especies de *Listeria*.

Es un método rápido que es muy utilizado por industrias de alimentos y bebidas para confirmar especies de patógenos que muchas veces por métodos tradicionales suelen ser más tardados y ocupar más espacio.

Las principales ventajas de este método son:

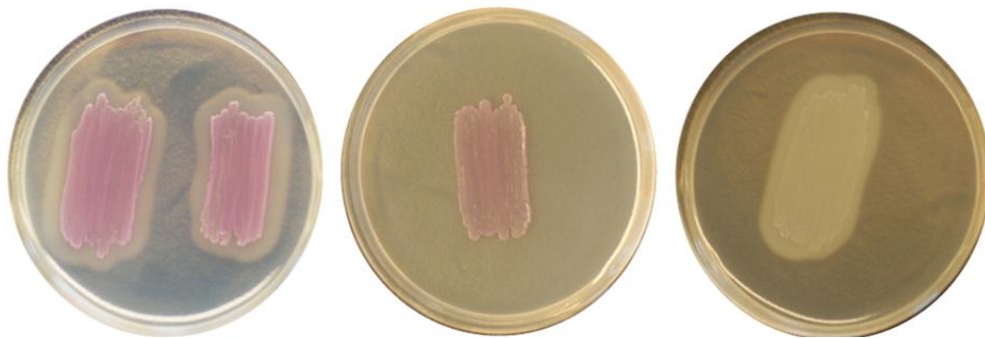
- Sensibilidad: todas las cepas de *Listeria monocytogenes* son características a las 24 horas de incubación.
- Especificidad: otras bacterias distintas a *L. monocytogenes* son incoloras o sin halo.
- Selectividad: alto grado de inhibición de la flora contaminante secundaria.
- Fácil lectura e identificación sencilla (CHROMagar™, 2016).

Figura 9. Reacción de color de CHROMagar BBL™ *Listeria*



Fosfolipasa para *L. monocytogenes*: L- α -fosfatidilindostol-fosfolipasa-C (PI-PLC); para *L. ivanovii*: C-fosfatidilcolina-fosfolipasa (PC-PLC). (AFNOR CHROMagar™ *Listeria*, 2009; CHROMagar™, 2016).

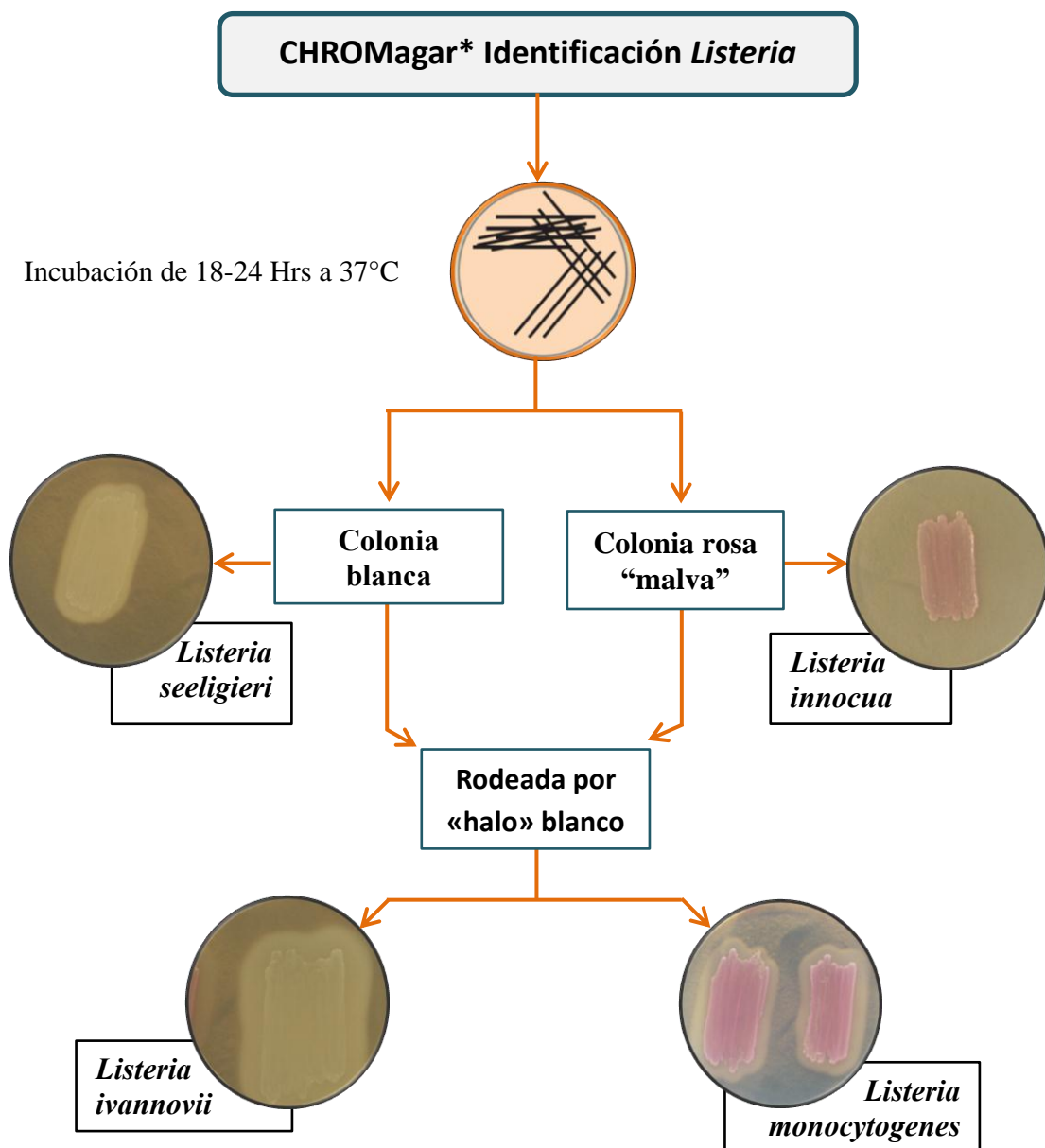
Figura 10. Aspecto típico de las colonias en CHROMagar™ para la confirmación de especies de *Listeria*; izquierda *Listeria monocytogenes*, central *Listeria innocua*, derecha *Listeria ivanovii* (CHROMagar™, 2016).



Se prepararon las placas de CHROMagar™ *Listeria* de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Una vez obtenidas dichas placas, se tomaron asadas de las colonias confirmadas por las pruebas bioquímicas mencionadas anteriormente, sembrando las colonias aisladas por estría en el medio cromogénico y posteriormente se incubaron de 18 a 24 horas a 37°C,

evitando la exposición de las placas a la luz. La lectura de las características de las colonias se realizó de acuerdo a las especificaciones del fabricante (ver figura 11).

Figura 11. Interpretación de resultados para medio cromogénico
BBL™ CHROMagar *Listeria*



(CHROMagar™, 2016).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Resultados del Objetivo particular 1

3.1.1 Aislamiento microbiológico de *Listeria monocytogenes*

Al realizar la reactivación de las células en el primer preenriquecimiento, se pudo fomentar la multiplicación de las mismas, ya que el agua peptonada para las muestras de leche de cabra brinda las condiciones fisiológicas idóneas para las células dañadas, acondicionándolas y preparándolas para el análisis. Esto se comprueba porque al realizar un pretratamiento directamente con Demi Fraser y no hubo cambios de coloración en el medio.

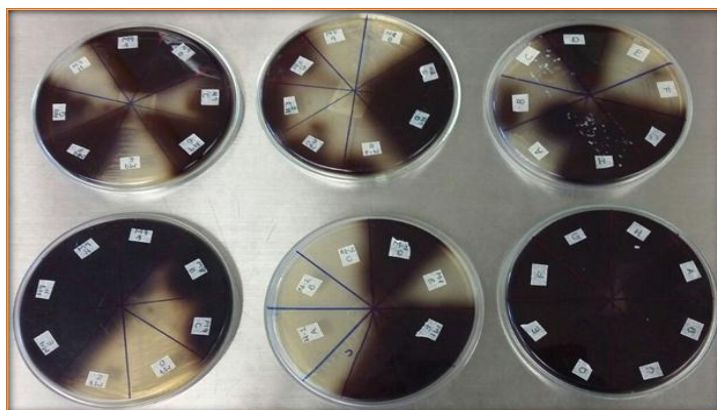
Después del tiempo de incubación de las *Listerias* en el agua peptonada, se continuó con la inoculación en el caldo Demi Fraser (segundo pretratamiento) y posteriormente en el enriquecimiento con Fraser, dado que estos caldos poseen inhibidores de bacterias contaminantes que interfieren en la reproducción rápida de las listerias (compitiendo con ella por el sustrato del medio) (Ramírez, 2006) y dada su presencia degradaron la esculina haciendo que ambos caldos se tornaron de color amarillo a negro (ver figura 12), para después aislarlas en las placas de medio Oxford.

Figura 12. Reacción de esculina positiva en Demi Fraser



Se seleccionaron solo las colonias que al visualizar en el medio Oxford Modificado (ver figura 13), presentaron un color blanco-grisáceo, forma redonda y diminuta, que además formaron un halo negro o café muy oscuro en su alrededor. *Listeria*, tiene la capacidad de hidrolizar el glucósido esculina (que forma parte de la fórmula del medio de cultivo) a esculetina y glucosa en presencia de bilis generando tal oscurecimiento del medio (Escobedo, 2014).

Figura 13. Colonias sospechosas de *Listeria* en medio OXFORD.



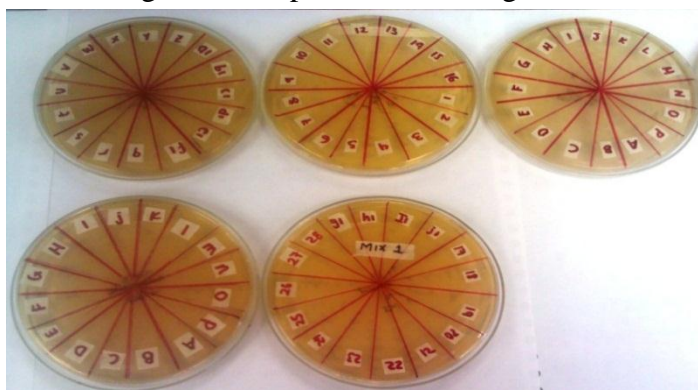
Las características morfológicas de las colonias de *Listeria* se observaron más detalladas al purificarlas en medio TSA (ver figura 14), en donde además se observaron los bordes enteros de las colonias y se pudieron separar para poder identificarlas.

Figura 14. Colonias sospechosas en medio TSA.



Se aislaron en total 183 cepas sospechosas de las 21 mezclas de leche; todos los aislamientos se conservaron en cajas de Petri con agar TSA (ver figura 15) y se almacenaron a una temperatura de 7°C.

Figura 15. Cepas aisladas en agar TSA.



En la tabla 10 se muestran el total de cepas aisladas por granja y por mezcla de leche, cabe mencionar que dichas cepas tenían características diferentes algunas eran de color blanco brillantes, otras opacas y más oscuras, pero se seleccionaron aquellas que hicieran virar el medio Oxford, tal como lo indica el procedimiento de la NOM-143-SSA1-1667.

Tabla 10. Aislamientos sospechosos de *Listeria* a partir de muestras de leche de cabra

Granja	Mezclas	Aislamientos por mezcla	Total por granja	Porcentaje de incidencia
EP	M1	32	100	55 %
	M2	0		
	M3	28		
	M4	0		
	M5	32		
	M6	0		
	M7	8		
RM	M8	0	0	0%
LL	M9	32	40	22%
	M10	0		
	M11	0		
	M12	8		
SB	M13	14	26	14%
	M14	12		
DP	M15	1	1	0%
LN	M16	0	0	0%
	M17	0		
	M18	0		
LO	M19	0	16	9%
	M20	5		
	M21	11		
TOTAL		183	183	100%


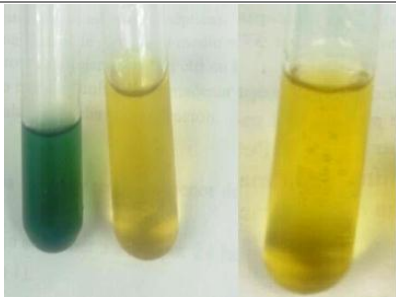
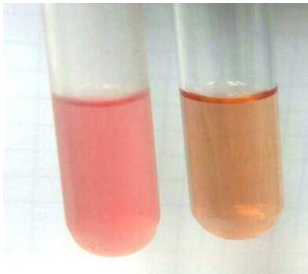
La granja que tuvo mayor número de aislamientos sospechosos fue “EP” obteniendo 100 cepas sospechosas (el 55%), la segunda granja nombrada como “LL”, con 40 aislamientos (el 22% de cepas aisladas) y la granja “SB” con 26 aislamientos sospechosos (14%). Del resto de las granjas: “DP”, “LN” y “RM”, no se obtuvieron cepas sospechosas de *Listeria*, por lo cual se descartan estas granjas para la siguiente etapa del análisis, determinando así que estas últimas tres granjas caprinas no tienen problemas de listeriosis en sus animales.

3.2 Resultados del objetivo particular 2

3.2.1 Identificación del género

Todas las cepas sospechosas fueron sometidas a pruebas bioquímicas primarias de tinción de Gram, su confirmación con KOH, oxidasa y catalasa, para descartar las cepas que no pertenezcan al género *Listeria*, obteniendo en esta primera etapa 60 cepas aisladas (32.78%), para identificarlas y diferenciarlas de otro género como es el caso del *Corynebacterium*, que no se descartó con las pruebas anteriores debido a que es muy semejante a *Listeria* y tienen las mismas características morfológicas (Ray, 2004), se realizaron las pruebas de identificación: Oxidación-Fermentación (OF), Voges Proskauer y Ureasa, para obtener solo las cepas que si pertenecieran a *Listeria spp.*

Tabla 11. Resultados de las pruebas bioquímicas para la selección de las cepas sospechosas de *Listeria*

Prueba	Positiva (+) <i>listeria</i>	Reacción
Voges Proskauer (VP)		Formación de anillo rojo-naranja la superficie del medio.
Oxidación-Fermentación (OF)		Vire del indicador del tubo de OF cerrado debido a la producción de gas en su interior y fermentación aerobia en el tubo abierto
Ureasa	Negativa (-) <i>Listeria</i>	Débil color “salmón”, en todo el caldo
		

(McFaddin, 2003; Barrow & Feltham, 2003).

A partir de estas pruebas se obtuvieron solo 17 cepas que pertenecieron al género *Listeria*, lo cual representa el 9.8 % del total que se aislaron en un principio; debido a la serie de pruebas bioquímicas realizadas se encontró que además de *Listeria* había presencia de *Corynebacterium* (en un 22.98%), de diferentes especies como *C. matruchotti*, *C. vitarumen* y *C. aquiatricum*, algunas saprófitas y otras provenientes del animal y/o el ambiente como suelo y agua. Al igual que *L. monocytogenes* que es muy ubicua y patógena, estas bacterias pueden ser causantes de graves infecciones en los animales, por ejemplo mastitis y contaminar la leche además de propagarse en el ambiente, enfermar a otras cabras y transmitirse al ser humano (Brook, 2003).

3.2.2 Identificación y confirmación de la especie *L. monocytogenes*

3.2.2.1 Pruebas bioquímicas: fermentación de carbohidratos

Para la identificación de la especie en estudio *L. monocytogenes*, se clasificaron las 17 cepas de *Listeria* asignándoles una letra para su análisis, para las pruebas de fermentación de los siguientes azúcares: Manitol, Lactosa, Salicina y Xilosa, las cuales se eligieron para diferenciar *L. monocytogenes* de las demás especies: *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. murrayi* (Escobedo, 2014; Mac Faddin, 2003).

Las pruebas bioquímicas de fermentación de carbohidratos, se utilizan para determinar la capacidad que tienen algunas bacterias para usar estos carbohidratos como fuente de energía, el medio de cultivo contiene otros constituyentes para el crecimiento tales como fuente de nitrógeno y minerales como sodio el cual fomenta la producción de nuevas células (Mac Faddin, 2003).

Se consideraron negativas (-), debido a que el indicador rojo de fenol no viró el medio de cultivo a un color rosa-rojo, a un pH alcalino de 7.4, lo cual indicó que no hay producción de ácido (el microorganismo no degradó el azúcar) y positiva (+) cuando el indicador viró a color amarillo a pH de 6.8 o menos, indicando la producción de ácido debido a que el microorganismo utilizó los azúcares del medio para su metabolismo (ver figura 16).

Figura 16. Reacciones de pruebas de carbohidratos para la identificación de *L. monocytogenes*.



Derecha, (NR) sin reacción; centro, reacción positiva; izquierda, reacción negativa.

Después de comparar dichas reacciones y conforme datos bibliográficos se logran descartar 3 cepas en donde las reacciones de fermentación de carbohidratos ocurridas, no correspondieron a ninguna especie de *Listeria*, obteniendo solo 14 cepas que cumplieron con todas las pruebas primarias y secundarias para su identificación. Los resultados se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Identificación de las diferentes especies de *Listeria* mediante prueba de fermentación de carbohidratos

Muestra	Cepa	Manitol	Lactosa	Salicina	Xilosa	Especie
M1	A	-	+	+	-	<i>L. innocua</i>
M1	B	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M4	C	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M4	D	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M4	E	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M5	F	-	+	+	-v	<i>L. innocua</i>
M5	G	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M5	H	+	+	+	-	<i>L. grayi</i>
M5	I	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M5	J	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M9	K	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M9	L	-	+	+	+	No pertenece al género
M12	M	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M12	N	-	-	-	-	<i>L. seeligieri; L. welshimeri</i>
M14	O	+	-	-	-	No pertenece al género
M14	P	-	+	+	-	<i>L. monocytogenes</i>
M14	Q	+	+	+	+	No pertenece al género

3.2.3 Confirmación de las especies mediante la prueba con medio cromogénico específico para *Listerias*: BBL™ CHROMagar™ *Listeria*

Se sembraron las 14 cepas identificadas como *L. monocytogenes*, para su confirmación por medio de las características que formaron las colonias en las placas de medio cromogénico específico y así diferenciar las especies.

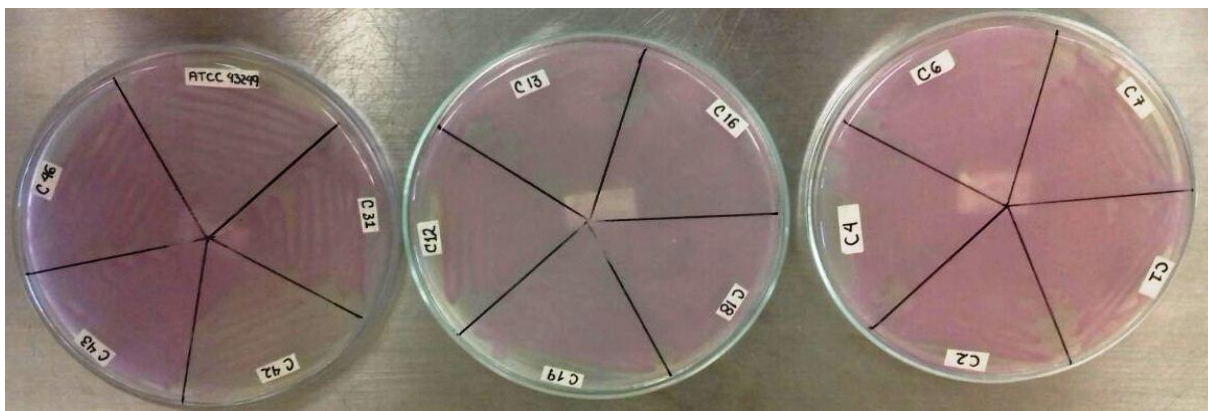
La interpretación de los resultados de las placas de medio cromogénico se llevó a cabo como lo establece el fabricante (ver la figura 11), el cual de acuerdo a la coloración (rosa o blanca) de las colonias y si hubo o no formación del precipitado en forma de Halo alrededor de las mismas, confirmaría las especies *monocytogenes*, *innocua*, *seeligieri* e *ivanovii*, para dicha prueba.

Transcurrido el tiempo de incubación de las placas de medio cromogénico, se observaron las características de cada una de las colonias, las cuales efectivamente presentaron una coloración rosa malva (ver figura 17), lo cual describe que las 14 cepas son *Listeria*; 10 cepas tuvieron formación del halo alrededor de la colonia, el resto no lo formaron; esto se comparó con una cepa de referencia de *Listeria monocytogenes* (ATCC 43249), que de igual manera se sembró en las placas de medio cromogénico.

La prueba también permitió conocer que en una cepa había dos especies juntas, cuales no se pudieron distinguir ampliamente ya que las pruebas bioquímicas para estas dos especies son muy similares, el medio permitió observar colonias rosas malva con un muy ligero halo en algunas partes de los bordes y en otras un halo más ancho, lo cual significa que la cepa está compuesta por ambas bacterias que no pudieron seleccionarse o al momento de la siembra en el medio cromogénico pudieron haberse juntado.

Se llegó a la conclusión que se tratan de las especies *L. monocytogenes* y *L. innocua*, ambas conformaban la misma cepa, lo que significa que alguna muestra cuenta con estas dos especies que no pudieron ser separadas por el método de siembra tradicional, la primera que es patógena y la segunda que posiblemente se encontraba de manera saprofita en la leche.

Figura 17. Crecimiento de las colonias de *Listeria* y ATCC 43249 en el medio Cromogénico.



Los resultados de la interpretación de las cepas se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 13. Resultados de la prueba de confirmación con medio cromogénico

Granja	Muestra	Cepa	Especie Confirmada	Colonia Formada
EP	M1	A	<i>L. innocua</i>	Colonia color blanco sin halo
EP	M1	B	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo
EP	M4	C	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo
EP	M4	D	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo
EP	M4	E	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo
EP	M5	F	<i>L. innocua</i>	Colonia color blanco sin halo
EP	M5	G	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo
EP	M5	I	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo
EP	M5	J	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo
LL	M9	K	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo
SB	M12	M	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo
SB	M12	N	<i>L. seeligeri</i> ; <i>L. welshimeri</i>	Colonia blanca sin halo
SB	M14	P	<i>L. monocytogenes</i>	Colonia rosa malva con halo

3.3 Resultados del objetivo particular 3

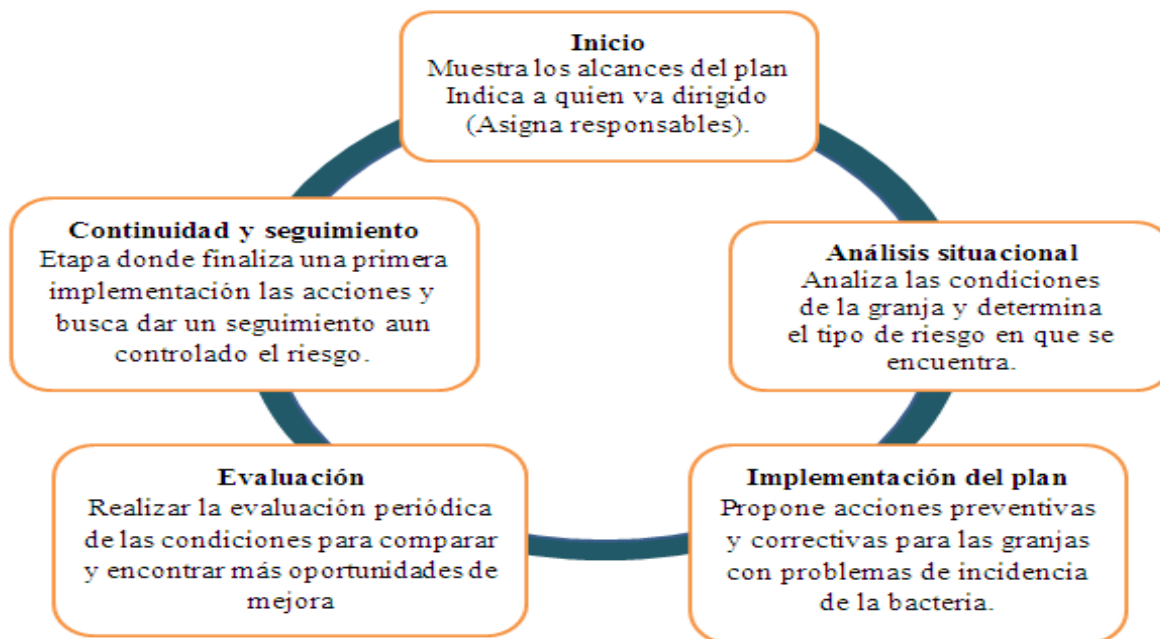
3.3.1 Propuesta de plan de control y prevención de riesgos por la presencia de *L. monocytogenes*

Un plan de control y prevención constituye una base en la organización de algunos sistemas de control de la inocuidad de los alimentos; cuando sea posible y práctico, estos sistemas deben incluir la evaluación de riesgos, basada en la peligrosidad de un agente específico, con la finalidad de desarrollar una serie de medidas para el control de un riesgo (FAO, 2016).

3.3.1.1 Presentación del plan

Después de confirmar la presencia de *L. monocytogenes* en las muestras de leche de cabra analizadas y evaluando los riesgos y el impacto que tiene la enfermedad sobre la salud pública además las pérdidas económicas que genera para una granja productora de leche caprina, se da a conocer una propuesta de un plan basado en la normatividad nacional e internacional para la de prevención de listeriosis en granjas de producción intensiva y semi-intensiva, el cual ayudará a mantener la inocuidad en el establo, prevenir y evitar un peligro de contaminación del patógeno a la leche, animales y granja en general así como el establecimiento de un control para reducir estos riesgos. Este plan consta de 5 etapas (ver figura 18).

Figura 18. Etapas del plan de control y prevención de riesgos para granjas caprinas



3.3.1.2 Inicio

La propuesta de plan de control y prevención de riesgos por *L. monocytogenes*, contiene una serie de acciones para incrementar la inocuidad en la granja, está propuesta va enfocada a todo el personal que labora en ella: operarios, ganaderos, veterinarios, visitantes y personal dedicado en la elaboración de productos derivados de la leche, con el fin de ser un material de apoyo para que evalúen las condiciones del lugar y encuentren puntos donde pueden verse afectados por la contaminación del patógeno, para que en caso de un brote de listeriosis se pueda controlar evitando la propagación del patógeno a los demás animales, a la materia prima y al personal involucrado.

3.3.1.3 Análisis situacional

El primer paso es llevar a cabo la evaluación de las condiciones en las que se encuentra la granja caprina, se recomienda el uso de una lista de verificación que permita valorar el estado general de los animales, el proceso de ordeño, las instalaciones y el almacenamiento de la leche. La lista de verificación (anexo A) es una de las formas más objetivas de valorar el estado de aquello que se somete a control.

La lista de verificación se elaboró con base a:

- Manual de leche de cabras y sanidad (SAGARPA, 2014).
- Evaluación de la Calidad en la Canal Caprina (INIFAP, 2003)
- Manual de buenas prácticas de ordeño (FAO, 2012).
- NOM-061-ZOO-1994. Especificaciones zoonosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal.
- NOM-091-SSA1-1994. Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias.

La evaluación se llevara a cabo conforme al puntaje descrito en la tabla 14, que permitirá clasificar las condiciones en las que se encuentra la granja y efectuar las medidas correspondientes.

Tabla 14. Criterio de evaluación para la lista de verificación aplicada a las granjas caprinas productoras de leche

Condición	Puntuación	Evaluación	Acciones
Excelente	>95%	Sin riesgo aparente	Es importante dar un seguimiento y vigilar cada uno de los criterios, aunque la puntuación es alta no se descarta que pueda originarse un evento.
Muy buena	85-94.99%		
Buena	75-84.99%	Riesgo reducido	Las condiciones en la granja son buenas sin embargo tiene áreas de oportunidad donde efectuar las acciones correctivas correspondientes
Regular	65-74.99%	Riesgo controlable	Tiene algunas fallas que deben mejorarse oportunamente.
Mala	<64.99%	Riesgo crítico	Se deben establecer inmediatamente las acciones correspondientes del plan para evitar que el riesgo aumente.

(Cruz, 2014)

3.3.1.3 Implementación del plan

Dentro de las estrategias que conforman el plan de control y prevención de riesgos, se proponen las siguientes medidas que involucran a toda actividad dentro de la granja, con el fin de que se implementen de manera inmediata, para controlar el riesgo en caso de que la evaluación de la granja lo indique. Y como medidas preventivas para las granjas que se encuentren en excelentes o muy buenas condiciones.

Manejo del ganado caprino
Se deben de considerar medidas de bienestar animal, con el fin de proporcionar un ambiente adecuado para la crianza y vivienda de las cabras en las granjas, el resultado será que el animal cuente con condiciones aptas de salud y por lo tanto sea menos propenso a sufrir de enfermedades entre ellas la listeriosis, que principalmente incide en animales en condiciones vulnerables, además de tener un control en el ganado y en el proceso de obtención de la leche (SAGARPA, 2014)

<p>Ganado caprino en general</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Distribuir al ganado caprino en los establos, de acuerdo a la actividad destinada: Cabras lecheras, para carne, doble propósito (carne y leche), la finalidad es ubicar a cada animal y en caso de alguna incidencia pueda actuar de manera inmediata. ▪ Identificar a las cabras de acuerdo a su posición y ubicación dentro de la granja incluyendo el nombre del responsable o ganadero. La manera más adecuada es colocar a la cabra un sello plástico en la oreja, donde venga la información básica de la cabra así como un número de identificación. ▪ Con el fin de tener un control documental de cada uno de los animales que se encuentran en la granja caprina y la relación con su origen y actividad destinada, se recomienda elaborar un formato que contenga dicha información el documento propuesto se presenta en el anexo B.
<p>Caprinos con listeriosis</p>	<p>Se deben aplicar a todo aquel animal que tenga los síntomas de enfermedad como se describe en el anexo C.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Aislar a la cabra con listeriosis del resto, llevándola a un espacio en la granja alejado de las otras cabras, ya que el patógeno contagia a la cabra por vía oral y/o fecal de manera muy rápida. ▪ Medir su temperatura corporal y llevar un plan de tratamiento de acuerdo a los síntomas y comportamiento (Anexo D). ▪ Limpiar inmediatamente la zona donde se encontraba la cabra, recoger el ensilado con ayuda de un utensilio fácil de sanitizar. Para este caso, el operario debe portar guantes, cubre bocas, mandil y botas, ya que las fuentes de contaminación del patógeno a la cabra son variadas. ▪ Revisar de inmediato el resto de los animales que se encuentren cerca ya que pudieron haber estado expuestos en algún instante al patógeno, las cabras pueden ser asintomáticas y durante periodos de estrés, desarrollar la enfermedad y liberar grandes cantidades de los

	<p>microorganismos en las heces (Álvarez, Tenorio & Bernal, 2015).</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ En el caso de las cabras preñadas, en lactancia, cabritas y animales de nueva adquisición, se debe hacer énfasis en la limpieza y sanitización de la zona del establo en donde se encuentren, ya que son los animales con mayor susceptibilidad al contagio (Díaz et al., 2015). ▪ El animal infectado debe revisarse de manera inmediata por un médico veterinario que administrará el tratamiento necesario.
<p>Tratamiento de cabras con listeriosis</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Clortetraciclina, por vía intravenosa en dosis de 10 mg/gr de peso por día durante 5 días, siendo efectiva para la encefalitis en ganado. ▪ Tetraciclinas, cloranfenicol y penicilinas, aunque su sensibilidad puede variar entre sus cepas; el tratamiento con tetraciclinas, es eficaz para la infección pero no suele resultar práctico cuando las lesiones han alcanzado un cierto desarrollo, ya que en las cabras persisten secuelas irreversibles (Díaz et al., 2015). <p>Las cepas de <i>L. monocytogenes</i> son resistentes a medicamentos como: Cefalosporinas, sulfamidas y ácido nalixídico, la cual la convierte en un problema clínico, ya que estos antibióticos son muy comunes para el tratamiento de enfermedades infecciosas en el ganado (Álvarez et al., 2015).</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Después del brote la cabra debe permanecer en cuarentena en un establo apartado de los otros para evitar el contagio.
<p>Higiene en la Alimentación</p>	
<p>Es de suma importancia evitar que todo alimento y agua destinados a la nutrición de los animales productores de leche presente contaminación: física, química o microbiológica en niveles que sean un riesgo para el bienestar del animal (SAGARPA, 2014), el alimento y el agua deben cumplir con lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Suministrar la ración adecuada y balanceada e identificar todas las fuentes de nutrientes y contaminantes en los terrenos de donde obtienen el alimento. ▪ Llevar a cabo un registro o inventario de los alimentos suministrados diariamente al ganado (ver anexo E). 	

- Todos los productos: aditivos, soluciones de limpieza, sanitizantes y otros químicos, usados en comederos e instalaciones que tengan contacto directo con el alimento del

- ganado y equipo de ordeña deberán ser aprobados por la SAGARPA para su uso en el ganado productor de leche (SAGARPA, 2014).

Llevar a cabo la limpieza y sanitización constante de los pasillos de acceso a los comederos para evitar la acumulación de excretas, lodo, agua y escombros, que puedan

- Contaminar el alimento.
- Se debe evitar que las cabras consuman ramas y hojas cerca de lugares con basura y materia fecal de otros animales.
- El proceso de preparación del ensilado debe garantizar que el descenso del pH sea rápido para evitar que *L. monocytogenes* se reproduzca llegando a ser un foco de contaminación, cuando el silo no está bien prensado o el material a ensilar se colecta húmedo.
- Toda desviación en el proceso de fermentación de los ensilados de hojas y hierbas, va a ser un riesgo para la multiplicación de *Listerias*, por lo que se recomienda el uso de aditivos para mejorar la fermentación y esta sea rápida y eficiente (Álvarez et al., 2015).

Higiene del agua de la granja

El agua que se utiliza en todas las operaciones de producción primaria debe ser apta para el uso al que está destinada, y no debe contribuir a la introducción de peligros en la leche (CAC/RCP, 2004).

- La única agua que puede entrar en contacto con el equipo y otras superficies de contacto con la leche es el agua potable (NOM-127-SSA1, 1995).
- El agua, debe ser proveniente de fuentes naturales y de la red de distribución, evitando el uso de aguas residuales.
- No se debe reutilizar el agua que provenga de algún lavado, bajo ninguna circunstancia, ni se debe utilizar para regar el terreno, ya que podría contaminar el medio donde la cabra pastorea.
- Las aguas estancadas son lugares donde se refugian bacterias y se reproducen plagas

como moscas, deben evitarse encharcamientos cerca de la granja y en los alrededores de los terrenos de pastoreo (FAO, 2010).

Higiene durante el ordeño

Antes de comenzar el ordeño, el ordeñador debe controlar su higiene personal:

- Uñas cortas y limpias.
- Manos limpias: durante el ordeño, lavarlas tantas veces como sea necesario.
- Usar guantes desechables ayuda a reducir la diseminación de bacterias contagiosas de un animal a otro. También ayuda a reducir la contaminación por bacterias de las manos del operador a la leche cruda.
- Aunque se ordeñe al aire libre, el buen tambero debe contar con cantidad suficiente de agua limpia como para higienizar sus manos antes de comenzar el ordeño y tantas veces como sea necesario durante el mismo (Nieto, 2012).
- Asustar o estresar a la cabra provoca la liberación de hormonas al torrente sanguíneo, que pueden interferir con la bajada normal de la leche reduciendo la resistencia o inmunidad natural de la cabra contra *L. monocytogenes* u otro microorganismo patógeno (Díaz et al., 2015).
- Los animales de ordeño se deberán mantener tan limpios como sea posible, antes de ordeño.
- Las tetillas deberían estar limpias después del ordeño, para ello se realiza el procedimiento de “sellado del pezón”, que consiste en enjuagarla en agua de limpia y tibia de preferencia, además de una solución diluida de yodo-cloro (ver anexo F) (SAGARPA, 2014).
- Una vez finalizado el ordeño, enjuagar los utensilios con agua fría; esto evita que se peguen la grasa y las impurezas existentes.
- Limpiar con agua caliente (70-80°C) con detergente, preferentemente con bactericida y esponja verde o cepillo todos los utensilios. También los liencillos deben ser lavados con agua fría, y luego agua caliente y detergente.
- Enjuagar todo, eliminando el detergente con agua limpia a temperatura ambiente.

Ordeño mecánico

- Respetar los horarios de inicio de ordeño: todos los días a la misma hora, a la mañana y

a la tarde, cada doce horas entre ordeños. Por ejemplo: a la mañana a las 5 y a la tarde a las 17.

- Antes de comenzar el ordeño, verificar el aceite de la máquina de ordeñar. Nunca debe estar por debajo del nivel mínimo (Díaz, 2002).
- Verificar el estado de las pezoneras y cambiar los juegos completos cada 2.000 ordeños por bajada. Si se rompe una pezonera, cambiar el juego completo para que todas tengan la misma plasticidad durante el proceso de ordeño, y dejar las usadas por cualquier problema que surja de no tener repuesto para otra rotura (Nieto, 2012).
- Las pezoneras que se guardan deben limpiarse y secarse a la sombra (nunca usar agua con lavandina), colocarle talco sanitario y envolver con papel. Antes de usar nuevamente, eliminar el talco con agua y limpiar manualmente con detergente.
- Controlar los filtros. Es conveniente soplar con aire comprimido no menos de una vez por mes para mantenerlos en condiciones de funcionamiento y sanitarias correctas.
- La máquina de ordeñar debe recibir dos servicios técnicos anuales de rutina. Es conveniente llevar los controles de los servicios técnicos anotados para tomar la precaución de llamarlos con tiempo (Cofre, 2001).
- Eliminar los primeros chorros de leche y ver si hay estrías o grumos que puedan hacer sospechar de mastitis, a fin de tomar las medidas necesarias tales como no enviar la leche del cuarto o cuartos enfermos con la leche cosechada. En ese caso ordeñar aparte y tirar; no aprovechar para alimentar a los caprinos.
- Esperar a que se llene o ingurgite el pezón. Este proceso, entre el punto 1 y 2, no tarda más de un minuto.
- Colocar las pezoneras teniendo cuidado de que no se introduzca aire en el circuito durante el tiempo que lleva este acto.
- El acto de ordeño normalmente dura entre cuatro y seis minutos (suele durar más si la máquina no funciona correctamente).
- Supervisar con cuidado el fin del ordeño, porque en caso de sacar las pezoneras antes de tiempo se pueden sufrir efectos perjudiciales en la ubre de la cabra.
- Sellar los pezones con una solución de yodo o Clorexidina, para evitar infecciones que puedan entrar por el orificio del pezón.

Limpieza y desinfección de utensilios y equipo de ordeño

El diseño del equipo de ordeño (donde se utilice) y los recipientes debe garantizar que no existan grietas ni entradas que puedan interferir con una limpieza apropiada.

- Los recipientes empleados deben limpiarse y desinfectarse con regularidad y con la frecuencia suficiente para reducir al mínimo o evitar la contaminación de la leche y la generación de biopelículas en ranuras y superficies.
- En caso de utilizar equipo de ordeño, deberá de estar diseñado de tal forma que no dañe las tetillas y las ubres durante las operaciones normales del ordeño (Marrufo, 2011).
- Si para el ordeño se utiliza algún tanque, revisar que drene completamente al momento de ser lavado, de la misma manera se deberá verificar que los químicos para limpieza/sanitizante, no se mezclen con la leche.
- En el caso de utilizar algún tanque se recomienda instalar un filtro para la leche; esto permite disminuir la cantidad de residuos indeseables en la leche, el filtro deberá ser reemplazado según las recomendaciones del fabricante (CAC/RCP, 2004).
- Las cisternas, cubetas, tanques y demás equipo de ordeño, donde se pueda almacenar la leche deben limpiarse y desinfectarse completamente después de cada operación de ordeño y secarse cuando proceda.
- Durante el enjuague de las cisternas, tanques y otro contenedor destinado para el almacenamiento de la leche, se debe eliminar todo residuo de detergente y desinfectante, salvo que las instrucciones del fabricante indiquen que el enjuague no sea necesario (CAC/RCP, 2004).
- *L. monocytogenes* genera biopelículas en las grietas, hendiduras y esquinas de cualquier utensilio o equipo, deberán limpiarse minuciosamente las zonas en donde no pueda llegar un utensilio de limpieza y agregar un sanitizante para removerlas por completo utilizando una solución de Hipoclorito de Sodio al 25 % o solución de yodo al 25 % (anexo F).
- Es de suma importancia establecer un orden en la limpieza del equipo (en el caso de ordeña mecánica) que entra en contacto con la leche, para ello es importante incluir un documento en donde se registre la frecuencia en la que se llevan a cabo la limpieza y

sanitización de cada uno de los equipos (anexo G).

Almacenamiento de la leche

- Revisar la temperatura del tanque frío (en caso de que se utilice), después de cada ordeña.
- Evitar el almacenamiento de la leche por más de 48 horas (Díaz, 2002).
- Inspeccionar la limpieza visual del tanque frío semanalmente y cuando se carezca de un tanque frío, los recipientes con leche pueden ser enfriados en agua con hielo (SAGARPA, 2014; CAC/RCP, 2004).
- Se debe llevar a cabo el retiro de la leche, cuando se presente un evento cuando esta no ha sido enfriada o almacenada en las condiciones idóneas (ver Anexo H). Si la leche entro en contacto con superficies contaminadas y/o sucias o si la temperatura del agua que se destina para el enjuague del equipo fue la correcta.
- El enjuague del equipo y las cisternas de almacenamiento después de la limpieza y desinfección debe eliminar todo residuo de detergente y desinfectante, salvo en caso de que las instrucciones del fabricante indiquen que el enjuague no es necesario.
- El agua utilizada para la limpieza y enjuague debe ser apropiada para tal fin, de tal manera que no determine la contaminación de la leche (NOM-091-SSA1, 1994).
- La leche fluida destinada al consumo deberá ser enfriada inmediatamente después del ordeño y mantenida a una temperatura no superior a 5°C hasta su recepción por el consumidor.
- Deberá ser expendida en envases esterilizados e inviolables.
- En el caso de ser leche cruda, este producto se rotulará en el cuerpo del envase: “Leche certificada cruda”, formando una sola frase con letras de igual tamaño, realce y visibilidad.
- En la tapa o en el cuerpo del mismo, en forma bien visible deberá consignarse la fecha de obtención y agregar la leyenda “Importante: calentar la leche hasta que levante el primer hervor, y bajar el fuego manteniendo la temperatura diez minutos.

Higiene en las instalaciones de la granja

- Las instalaciones deben estar adecuadamente ventiladas pero no

<p>Instalaciones cerradas</p>	<p>expuestas a corrientes de aire.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Las paredes y techos no deben presentar ningún tipo de condensación. ▪ Los comederos usados para ofrecer el forraje, concentrado y agua, deben estar contruidos y localizados de tal manera que el alimento no sea desperdiciado o contaminado.
<p>Instalaciones abiertas</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ los pasillos deben ser lo suficientemente amplios para mover al ganado y a los alimentos. ▪ Los pisos por donde transiten las cabras deberán estar acanalados para prevenir resbalones que puedan causar lesiones a la ubre, pezuñas u otras partes del cuerpo. ▪ Los comederos y bebederos usados, deben estar contruidos y localizados de tal manera que el alimento no sea desperdiciado o contaminado. ▪ Las instalaciones deben proporcionar fácil acceso de personal para observar la salud de las cabras, y requerir una mínima cantidad de trabajo para mover las cabras que se encuentren enfermas de listeriosis o alguna otra enfermedad de manera rápida (FAO, 2010; SAGARPA, 2014).
<p>Sala de Ordeña</p>	<p>Las instalaciones donde se realice el ordeño deben ser fáciles de limpiar, especialmente en las zonas propensas a ensuciarse como entradas/salidas y pasillos, deberán contar mínimo con:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pisos contruidos de forma que facilite el drenaje de líquidos y medios adecuados de remoción de desechos. ▪ Ventilación e iluminación suficientes. ▪ Una separación eficaz de toda fuente de contaminación, tales como sanitarios y el lugar donde se almacena el estiércol. ▪ Deben estar señalizados cada uno de los establos, de acuerdo a su actividad. ▪ Los utensilios para la limpieza deben ser única y exclusivamente de cada zona (SAGARPA, 2014; CAC/RCP, 2004).

<p>Sala de Ordeña</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ La iluminación debe ser natural el mayor tiempo posible. ▪ Todos los artefactos lumínicos deberán poseer protección. ▪ Deberá contar con ventilación apropiada para la renovación del aire. ▪ Deberá poseer instalaciones adaptadas para el lavado de los equipos, disponiéndose de agua y elementos para la limpieza (piletas, tanque de agua potable, productos químicos habilitados para la higienización). ▪ En el caso de ordeño manual, se debe contar con una instalación sencilla que permita el lavado de manos del ordeñador, previo a su tarea, teniendo disponible agua y elementos para la limpieza y secado. ▪ Deberá disponerse de recipientes para el almacenamiento de desechos separados del área de ordeño. ▪ Se deberán realizar tareas en forma continua, preventivas y organizadas, para evitar la contaminación por medio de las plagas (insectos rastreros y voladores, roedores, aves).
<p>Manejo de fauna nociva en las instalaciones</p>	
<p>Algunas plagas importantes en los establos son los roedores, moscas, pájaros, insectos rastreros y voladores, para su control es importante tomar en cuenta las siguientes recomendaciones:</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Identificar las posibles plagas, las rutas que estas tengan y la zona de entrada o alojamiento (SAGARPA, 2014). ▪ Limitar el acceso de pájaros a la sala de ordeña, almacén de alimento e instalaciones con protecciones en ventanas. ▪ El excremento de los pájaros representa un riesgo general de sanitización en el establo y salud del animal. Los pájaros pueden además acarrear y transmitir enfermedades a las cabras. 	

- Aplicar medidas apropiadas para el control de insectos: remoción de cualquier derrame de granos, el uso de un exterminador de moscas, membrana pegajosa, etc. (FAO, 2010).
- Realizar la limpieza de los pasillos, principalmente en las áreas de congregación de moscas al menos una vez por día.
- Limpiar los corrales y hendiduras al menos dos veces a la semana durante los meses de verano.

Evitar la acumulación de estiércol cerca de las zonas de ordeño y corrales, para evitar la

- proliferación de moscas u otro tipo de plaga en los alrededores de la granja.
- Si resulta necesario recurrir a medidas químicas para el control de plagas, dichos productos deben estar aprobados oficialmente para el uso en instalaciones alimentarias y emplearse de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Marrufo, 2011).

Higiene del personal

Las prácticas de higiene personal tienen como principal objetivo crear conciencia de la importancia de evitar el riesgo de contaminación de la leche, estas prácticas comprenden:

- Las reglas de higiene del personal en cada una de las áreas del establo, serán colocadas a la vista de todo el personal que allí labora.
- El personal de ordeño debe hallarse en buen estado de salud, todo aquel que se sospeche tenga alguna enfermedad con probabilidades de transmitirse a la leche no deben entrar a las zonas donde hay una manipulación directa de la leche. De igual manera niños, mujeres embarazadas y personas con alguna enfermedad degenerativa tienen prohibido el paso a corrales donde se encuentren cabras con listeriosis o algún otro padecimiento (FAO, 2010).
- Lavado de manos y antebrazos (hasta el codo), con frecuencia, y en todos los casos antes de iniciar la ordeña y la manipulación de la leche.
- No tener lesiones en las manos o antebrazos, ya que de haberlo deberá cubrirse con guantes (SAGARPA, 2014).
- Al inicio de cada ordeño se debe usar una gorra, cofia o ambas que cubran totalmente el cabello, para evitar su caída sobre el área de trabajo, un cubrebocas, un delantal de plástico, para las operaciones que requieren de su protección y guantes para acciones específicas que tengan contacto directo con la leche, además de calzado exclusivo para

cada área de trabajo (corrales y área de ordeña) o botas adecuadas (FAO/OMS, 2004).

- Evitar malos hábitos como ingerir comida en el área de trabajo, toser, estornudar, tocarse el cabello, o llevar las manos a la boca o nariz, el no hacerlo provocara que el patógeno se almacene en la piel o se ingiera accidentalmente (Marrufo, 2011).

Capacitación del personal

Algunos temas que se pueden tomar en cuenta para mostrar al personal de la granja son:

- El personal con los conocimientos amplios en temas de inocuidad deberá ofrecer al resto de los trabajadores un programa de entrenamiento sobre los siguientes temas:
 - El ordeño higiénico de los animales.
 - Manejo y distribución del ganado.
 - Seguridad en áreas de trabajo y mantenimiento de las instalaciones.
 - Los puntos críticos del proceso.
- Se deberá entregar al personal un programa de entrenamiento documentado sobre:
 - La producción de leche
 - Prevención y control de enfermedades.
 - Temas de contaminación cruzada.
- Establecer programas de higiene del personal, mediante:
 - Técnicas de limpieza y desinfección y manejo de productos químicos.
 - Higiene personal, mediante el uso de equipo de protección necesario para evitar la contaminación a la leche.
 - Identificar los peligros en caso de un brote por listeriosis y los principales síntomas, además de medidas de extrema precaución para evitar el riesgo de contraerla.
 - Administración de medicinas y dosis recomendadas, además de conocer los efectos secundarios y el deshecho de los materiales punzocortantes como agujas.
 - Prevención de accidentes y normas de seguridad.

Control de visitantes

Se debe establecer un plan específico para el control de visitantes en las zonas de ordeño y almacenamiento de la leche, el visitante debe cumplir con los siguientes requisitos:

- Su registro al ingreso y salida de la granja.
- Se recomienda el lavado de manos y calzado antes del ingreso a establos e instalaciones

(SAGARPA, 2014)

- A todos los visitantes internos y externos recomendarles cubrir su cabello, además de usar ropa y calzado adecuado, botas, guantes etc.
- Evitar que tengan contacto directo con animales, sobre todo si están aislados o en lactancia.
- Evitar el ingreso de visitantes que se sospeche puedan padecer algún síntoma de enfermedad o personas inmunocomprometidas como ancianos, mujeres embarazadas e incluso niños.
- No permitir el ingreso de personas con algún alimento.

3.3.1.4 Evaluación y seguimiento

Después de haber implementado la mayoría de las acciones del plan, se deben realizar evaluaciones semanales con apoyo de la lista de verificación para encontrar más oportunidades de mejora y hacer énfasis en aquellos puntos que no se han logrado cumplir. Esto con el fin de no descuidar partes que se creen cumplidas, por implementar otras, ya que todo descuido en el interior de la granja puede ser un punto de riesgo y originarse contaminación por la bacteria.

Se debe guardar toda documentación originada de la implementación del plan, para en caso de auditorías externas (pudiendo ser el caso), se tenga un sustento de que se están realizando mejoras en la granja y cuidando la trazabilidad de la materia prima a lo largo de la producción.

3.3.1.5 Continuidad

La última etapa del plan tiene el propósito de dar a conocer a todo el personal, que una vez realizadas las acciones correctivas y preventivas necesarias, se debe replantear nuevamente la problemática, la propuesta ayuda al ganadero a mantener la inocuidad durante todo el proceso de obtención de la leche, pero es necesario hacer que el plan sea continuo y repetitivo por lo que al llegar a esta etapa, se necesitara iniciar nuevamente para la búsqueda de más oportunidades de mejora. Con ello sin duda los riesgos se reducirán gradualmente, podrá incrementarse la producción, debido a que se lleva un control de todas las áreas y una reducción significativa de gastos por enfermedades del ganado, perdidas de materia prima y evitar problemas de salud pública en personas que consumen la leche de cabra, que allí se produce.

CONCLUSIONES

Aunque en México existen pocos datos sobre la listeriosis y su epidemiología ya que no es una enfermedad diagnosticada adecuadamente, la incidencia de éste patógeno cobra cada vez mayor importancia en salud pública a nivel mundial. Las pérdidas económicas que la listeriosis puede causar al productor se reflejan en la disminución de producción de la leche, por la mortalidad en el ganado debida a los síntomas nerviosos, abortos y demás síntomas que causa la listeriosis, además del problema de salud que puede generar como materia prima.

En este estudio se demostró la presencia de *Listeria monocytogenes* en la leche de cabra de granjas productoras en el estado de Chiapas, esta leche se utiliza para la elaboración de varios productos en diferentes regiones del estado, entre los alimentos elaborados a partir de esta leche están los llamados “quesos artesanales”, que son bastante consumidos y distribuidos en el lugar, por lo que el riesgo de la contaminación por el patógeno al humano, es alta.

Por ello se desarrolló esta propuesta de plan de control y prevención, que incluye las acciones necesarias para que el productor o ganadero las implemente y pueda mejorar la inocuidad de su granja, aumentar la productividad y calidad de su materia prima, mejorar su sistema de ordeño y almacenamiento de la leche pero sobre todo evitar que los animales de la granja se vean afectados y esto genere pérdidas económicas o un brote que posteriormente sea contraído por humanos y sea difícil de controlar, llevando a casos fatales.

Ninguna persona está exenta de contraer la enfermedad, dado que la bacteria resulta agresiva e invade los órganos más estériles del cuerpo, propagándose con facilidad. Actualmente en México los brotes han sido controlados pero sin duda es una enfermedad que ha llamado la atención de la comunidad científica en los últimos años; *Listeria monocytogenes* puede controlarse si se siguen las acciones adecuadas.

REFERENCIAS

- AFNOR, CHROMagar™ *Listeria* (2009). *Certificado de Validación como Método alternativo de acuerdo al Standard en ISO 11290-1A1-2004.*, Estudio colaborativo inter laboratorios, Provincia de Tandil Argentina.
- Albarracín, Y. (2008). “*Listeria spp.*, y *L. monocytogenes* en leche cruda de cabra *listeria spp*”. *Revista de MVZ Córdoba* v.5. DOI: 13(2):1326-1332.
- Albarracín, C.Y., Poutou, R., Carrascal, A.C. (2008). “*Listeria spp.*, y *L. monocytogenes* en leche cruda de cabra”, Instituto de Investigación en Ciencias Naturales y Biotecnología, Bucaramanga Colombia.
- Álvarez, M.C., Mendoza, E.S. (2005). “*Manual básico de Bacteriología*”. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2ª Edición. México, 128-131.
- Álvarez, M.C., Tenorio, G.V., Bernal, R.G. (2015). “*Enfermedades de las cabras: Listeriosis*”, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, México D.F.
- Aréchiga, C.F., Aguilera, J.I., Rincón, R.M., Méndez de Lara, S., Bañuelos, V.R., y Meza C.A. (2008). “Situación actual y perspectivas de la producción caprina ante el reto de la globalización”. *Tropical and Subtropical Agroecosystems Yucatán*, vol. 9, núm. 1, pp. 1-14.
- Barbera, M.J., Ascensión, M., (2016). “*Manual de Alimentos funcionales, aproximación a nueva alimentación*”. Instituto de Nutrición y Trastornos Alimentarios INUTCAM., Madrid, España. ISBN: 978-84-690-9493-8.
- Barrow, G.I., Feltham, K.A. (2003). “*Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria*”, 3ra Edición, Cambridge University Press, U.K.

- Becerra, C.M. (2013). "*Detección de Listeria monocytogenes en queso Cotija artesanal madurado*". Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- Bedoya, M.O., Rosero, N.R., Posada, L.S. (2016). "*Composición de la leche de cabra y factores nutricionales que afectan el contenido de sus componentes*". Ministerio de cultura y desarrollo ASOCABRA, Antioquia, Colombia. Recuperado de <http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/124/1/7.%2093-110.pdf>, Consultado el 19 de julio 2017.
- Bell, C., Kyriankides, A. (2000). "*Listeria, una aproximación practica al microorganismo y su control en los alimentos.*" 2da edición, Acriba, España.
- Brooks, G.F., Bute, J.S., y Ornston, N.L. (2002). "*Microbiología médica de Jawetz Melnick y Adelberg*", Manual Moderno, 17ª edición, México.
- (CAC/RCP, 2004), "*Código de prácticas de higiene para la leche y los productos lácteos*, FAO/OMS.
- Carrascal, C.A., Albarracín, C.Y., Sarmiento, T.P. (2007). "Incidencia de *Listeria monocytogenes* en leche de vaca expandida en el municipio de Pamplona Colombia", *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, Universidad de Pamplona, vol. 5, núm. 2, pp. 49-57: ISSN 0120-4211
- Castañeda, R.G., Eslava, C.C., Castro, C.N., León, F.J., Chaidez, Q.C. (2014). "Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica Salud Pública de México". *Instituto Nacional de Salud Pública*, (56): 654-659.
- Chavarrias, M. (2006). "*Zoonosis y seguridad alimentaria*". Boletín semanal 24 mayo 2007. Recuperado de: <http://www.consumaseguridad.com>, Consultado el 25 de agosto de 2017.
- Chacón, V.A. (2005). "*Aspectos nutricionales de la leche de cabra (capra hircus) y sus variaciones en el proceso agroindustrial*". *Revista de Agronomía Mesoamericana*, Vol. 16. ISSN: 1021-7444.

- CHROMagar™, (2016). “Manual identificación Listeria”. Recuperado de: www.CHROMagar.com, Consultado el 03 de septiembre de 2017.
- Cofre, B.P. (2001). “Producción de cabras lecheras”. Ministerio de Agricultura, Instituto de investigaciones Agropecuarias, Chillán Chile. ISSN: 0717-4829.
- Cruz, M.C.E. (2014). “Programa de Buenas Prácticas de Manufactura en el Taller de carnes de la Facultad de estudios superiores Cuautitlán UNAM”, Tesis de Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo de México.
- Cousens, L.P., y Wing, E.J. (2000). “Innate defenses in the liver during Listeria infection”. *Innuned Rev.* 174: 150-159.
- Díaz, E.A., Tortora, L.J., Palomares, R.E., y Hernández, G.J. (2015). “Enfermedades de las cabras”. Edición Científica de SAGARPA-Centro Nacional de Investigación en Microbiología Animal, México D.F.
- DIFCO & BBL. (2009). “Manual of Microbiological Culture Media”. Segunda edición. Bectón, Dickinson and Company. ISBN: 0-9727207-1-5
- Domínguez, F.J. (2008). “Incidencia en alimentos de Listeria monocytogenes”, Tesis de Licenciatura en Biología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala UNAM, Estado de México.
- Escobedo, P.D, (2014). “Aislamiento e identificación de Listeria monocytogenes en frutas y hortalizas mínimamente procesadas”, Tesis de licenciatura en Ingeniería en Alimentos, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. de México.
- FAO/OMS, (2004). “Evaluación de riesgos de Listeria monocytogenes en alimentos listos para el consumo: resumen interpretativo”. Servicio de Calidad de los Alimentos y Normas Alimentarias, FAO, Roma, Italia. ISBN: 92-5-305126-4.
- FAO, (2010). “Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias”, Comisión del Codex Alimentarius” 47ª Reunión, Caracalla, Italia.

- Flores, C.M., Pérez, L.R., Jurado, G.M., Basurto, S.M. (2009). “La leche de cabra y su importancia en la nutrición”. *Revista de creatividad y desarrollo tecnológico, Tecnociencia, Chihuahua, México*, 3(2): 107-113.
- Forbes, B., Sahm, D. y Weissfeld, A. (2009). “*Diagnóstico microbiológico*”, 12° edición, Editorial Panamericana, USA. p.p. 240.
- Gandhi, M. y Chikindas, L.M. (2007). “*Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive*”. *Review International Journal of Food Microbiology*. (113):1–15.
- GECC, (2013). “*Evaluación de la calidad caprina*”. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias., Ajuchitlán, Querétaro.
- Howard, G. y Shen, H. (2007). “*Listeria monocytogenes, pathogenesis and Host Response*”, Editorial Springer, 1° edición, EUA. ISBN-10: 0-387-49373-5
- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2004). “*Microorganismos de los Alimentos*“. *Análisis Microbiológico en la Gestión de la Seguridad Alimentaria*. Zaragoza: Acribia.
- ISO-1290-1:1996., (1996). Microbiología de los alimentos y piensos - Método horizontal, para la detección y recuento de *Listeria monocytogenes*- Parte 1: Método de detección.
- Jiménez, B.M., Partida, J.A., Alfaro, R.H., Soto, S.S., Torres, C.M. (2013). “*Evaluación de la Calidad en la Canal Caprina*”. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal. INIFAP. Ajuchitlán, Colón, Querétaro.
- Kirvis, T., Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A., y Mercado, M. (2005). “Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente”. *Revista MVZ Córdoba*, 10(1): 511-543.
- Koneman, E. y Allen, S. (2008). “*Diagnóstico microbiológico: Texto y Atlas en color*”, 6ª ed. Washington, editorial Panamericana.
- López, G.C., Fuentes, B.V., Figueroa, G.J., Sánchez, G.R., Serna, P.A., Ruiz, R.J., Echavarría CH.F., Salinas, G.H. (2011). “*Técnicas para la transformación de leche de cabra en*

- zonas marginales*”, Centro de Investigación regional Norte-centro, Campo Experimental, Zacatecas, México. ISBN: 987-607-425-715-1.
- López, V., Suárez, M., Chico-Calero, I., Navas, J., Martínez, J.V. (2006). *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? *Revista Argentina de Microbiología*, 38(4): 224-234.
- Luna, E.V. (2011). “*Estudio inmuno-enzimático para detectar anticuerpos contra Listeria monocytogenes en poblaciones caprinas*”. Tesis de Licenciatura en QFB, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. de México.
- FAO, (2010). “Manual para el Manejo Sanitario y Reproductivo de las Cabras.” Cumbre de Caracalla, Roma, Italia.
- FAO, (2011). “*Manual I de Buenas Practicas de Ordeño de la leche*”. Proyecto GCP/GUA/012/SPA II Fase, Guatemala. Obtenido de <http://www.fao.org.gt>. Consultado el 31 de Septiembre de 2017.
- Madigan, M.T., Martinko J.M., Parker, J. (2003). “*Brock: Biología de los microorganismos*” Décima edición, Editorial Pearson, Madrid, España.
- Martí, T.Q. (2002). “*Incidencia y comportamiento de Salmonella y Listeria en pechugas de pavo curadas*”, Tesis de Licenciatura de Químico en Alimentos, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
- Martínez, S.A. (2007). “*Incidencia de Listeria monocytogenes en alimentos*”, Trabajo Monográfico de Actualización, Licenciatura en Química de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, MÉXICO, D.F.
- Marrufo, P.M. (2011). “*Calidad sanitaria del queso tipo panela a nivel mercado sobre ruedas y tianguis*”, Médico Veterinario Zootecnista, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. de México.
- Mac Faddin, J. F. (2003) “*Pruebas Bioquímicas para la identificación de bacterias de Importancia clínica*”, 3ª ed., Medica Panamericana.

- Mendoza, Z.J. (2017). “*Comparación de la capacidad antimicrobiana del aceite esencial de orégano y sus derivados fenólicos nanoencapsulados sobre Listeria innocua*”, Tesis de Ingeniería en alimentos, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. de México,
- Muñoz, Á.B., Chávez, J.A., Rodríguez, E.C., Realpe, M.E. (2013). “*Listeria monocytogenes* en manipuladores de alimentos: un nuevo enfoque para tener en cuenta en los peligros de la industria alimentaria”. *Biomédica, Instituto Nacional de Salud Bogotá*. 33(2): 283-291.
- Nieto, D., Berisso, R., Demarchi, O., Scala, E. (2012). “*Manual de buenas prácticas de ganadería Bovina para la Agricultura familiar*”, FAO, Buenos Aires, Argentina. ISBN 978-92-5-307344-3
- NOM-027-SSA1-1994, (1994). Salud Ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que se debe someterse el agua para su potabilización.
- NOM-061-ZOO-1994, (1994). Especificaciones zoosanitarias de los productos alimenticios para consumo animal.
- NOM-091-SSA1-1994, (1994). Bienes y servicios. Leche pasteurizada de vaca. Disposiciones y especificaciones sanitarias.
- NOM-114-SSA1-1994, (1994). Bienes y servicios. Método para la determinación de *Salmonella* en alimentos.
- NOM-143-SSA1-1995, (1995). Bienes y servicios. Método de prueba Microbiológico para Alimentos. “Determinación de *Listeria monocytogenes*”.
- OIE, Terrestrial Manual *Listeria monocytogenes*, (2008), Chapter 2.7.9. Vol.1253.
- Pedraza, T.J. (2011). “*Manejo caprino y producción de quesos*”, Fundación Origen Escuela Agroecológica de Pirqué, *Santiago de Chile*.

- Peralta, M.A. (2009), “*Caracterización bioquímica molecular y determinación de virulencia de cepas de Listeria monocytogenes en productos agropecuarios chilenos*”, Tesis Grado Doctorado en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria., ETSIA. Dpto. Biotecnología, Universidad Politécnica de Valencia, España.
- PROY-NOM-012-ZOO-1993, (1994). Especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos.
- Ramírez B.G., (2007), “*Estudio de Listeria monocytogenes en leche de cabra*”, Tesis Grado Maestro en Ciencias, Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. de México.
- Ramírez B.G., (2014), “*Virulencia y tipificación molecular de Listeria monocytogenes aislada de explotaciones caprinas*”, Tesis Grado Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. de México.
- Ray, B. y Arun, B. (2010). “*Fundamentos de microbiología de los alimentos*”, 4ta ed., McGraw Hill, pp 202-331.
- Ray B., (2004). “*Microbiología fundamental de los alimentos*”. Tercera edición, CRC Press, L.C U.S: ISBN 0-8493-1610-3.
- Roberts, A.J. y Wiedmann, M. (2003). “*Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis*”. Cell. Mol. Life Sci. 60:904–918.
- SAGARPA, “*Manual de leche de cabras y sanidad*”, (2014). Recuperado de: http://www.sagarpa.gob.mx/ganaderia/publicaciones/lists/manuales%20de%20buenas%20prcticas/attachments/3/manual_cabra.pdf. Consultado el 23 de septiembre de 2017.
- Silva M.T. (2002). “*Patología y diagnóstico de laboratorio de los padecimientos ocasionados por Listeria monocytogenes*”, Trabajo Monográfico de Actualización para título en QFB, Facultad de Química, UNAM, México, D.F.

- Strassburger, M.M. (2014). “*Establecimiento de una PCR multiplex para la Serotipificación de aislados de L. monocytogenes*”, Tesis grado maestría en veterinaria zootecnista, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, Edo. De México.
- Turner, W. (2015). “La listeriosis en datos” *Revista CNN: en español*, vol. 12. Recuperado de cnnespanol.cnn.com. Consultado el 11 de septiembre de 2017.
- Torres, M.F. (2005). “*Manual práctico de bacteriología médica*”. Editorial Serviprensa C.A., Guatemala, Guatemala,
- Uta-Gasanov, A.V, Hughes, D., y Hansbro, P. (2004). “Los métodos para el Aislamiento e Identificación de *Listeria spp.* y de *Listeria monocytogenes*”, *FEMS Microbiology Reviews*, Newcastle, V.9, pp 851–875.
- Vega S., Gutiérrez, R., Ramírez, A., González, M., Díaz, G., Salas, J., González, M., Coronado, M., Schettino, B., Alberti, A. (2007). “Características físicas y químicas de leche de cabra de razas Alpino Francesa y Saanen en épocas de lluvia y seca”. *Revista salud animal*, Vol. 29 No. 3., Coyoacán, México. p.p 160-166.
- Zavala, T.S. (2012). “*Guía a la redacción en el estilo APA*”, 6ta edición., Universidad UMET, México, D.F.

ANEXOS

Anexo A. Lista de verificación

Lista de verificación para una granja productora de leche de cabra, sistema intensivo				
Fecha de aplicación: _____				
Responsable: _____				
Se marcara con una letra “X” el rubro que describa mejor el aspecto a evaluar. Favor de anotar las observaciones correspondientes en caso de marcar las categorías “Cumple parcialmente” o “no cumple”.				
<i>Aspecto a evaluar</i>	<i>Cumple</i>			<i>Observaciones</i>
	<i>Si (0 puntos)</i>	<i>Parcialmente (2 puntos)</i>	<i>No (3 puntos)</i>	
Manejo del ganado				
La granja se encuentra dividida en las secciones correspondientes, para cada tipo de función de las cabras.				
Los lugares para el alojamiento de las cabras están limpios, secos y sobre todo satisfacen el bienestar y salud de los animales.				
Todas las cabras, sin excepción cuentan con un arete de identificación.				
Se tiene la información de cada una de las cabras, documentada y al alcance.				
Hay un lugar exclusivo para las cabras que se encuentran enfermas.				
Este lugar se encuentra alejado de los demás corrales y áreas de almacenamiento de la leche.				
En cada una de las áreas se cuenta con utensilios y recipientes limpios,				

para emergencia en caso de que alguna cabra excrete algún tipo de fluido, para su desecho y evitar que entre en contacto con superficies.				
Instalaciones				
La granja se encuentra alejada de zonas urbanas, barrancos, depósitos de basura, aguas negras u otro foco de contaminación.				
Hay encharcamientos de agua o lodo en interiores o exteriores de la granja.				
Cuenta con vías de acceso que permiten el fácil ingreso y salida de insumos.				
Existe un registro o control del acceso de todo personal a la granja.				
Los pasillos se encuentran limpios y libres de algún foco de contaminación.				
Hay un área para el almacenamiento de todos los químicos (plaguicidas, semillas tratadas, etc.) lejos del almacén de la materia prima.				
Cuenta con silos de material apropiado para el almacenamiento de granos (Cuando aplique) y/o espacios para ensilaje.				
Cuenta con un sitio para almacenamiento de medicamentos veterinarios perfectamente identificados.				
Cuenta con un sitio para el almacenamiento de productos químicos agrícolas y otros insumos, debidamente identificados.				
Cuenta con servicios sanitarios retirados de la zona ordeño para ser utilizado por el personal que realiza las tareas de ordeño.				

Cuenta con un depósito de estiércol construido fuera del perímetro de las instalaciones de encierro y ordeño.				
Tiene un lugar específico para guardar los utensilios de limpieza, como un mueble con puerta e identificando su uso.				
Las lámparas o focos de iluminación cuentan con protectores, cuando aplique, para evitar cualquier peligro físico, en el caso que se quiebre o desprenda una lámpara o foco. Además de mantenerse limpios.				
Pisos				
Los pisos están ranurados y son de algún material antideslizante.				
Los pisos del área de ordeño son de material impermeable que permita una fácil limpieza.				
Cuentan con un desnivel apropiado hacia el drenaje para evacuar el excremento y aguas de lavado.				
El piso y las paredes de la sala de ordeño, se limpian diariamente con agua y detergente, de tal forma que no quede ningún residuo de estiércol, tierra, leche, alimentos o basura que puedan contaminar el lugar.				
Puertas y ventanas				
Tienen protecciones o mosquiteros para impedir la entrada de insectos.				
Se encuentran cerradas y aseguradas.				
Las puertas de los corrales son lo suficientemente amplias, para el paso del ganado y el personal.				
Techos y paredes				
Las paredes presentan aberturas para circulación del aire.				

Se encuentran protegidas con mallas de material no corrosivo, fácilmente removibles para su limpieza y reparación para restringir el ingreso fauna nociva.				
Los techos deben estar en buenas condiciones estructurales higiénicas.				
Área de ordeño				
Tiene una sala de ordeño bajo techo y/o delimitada del área exterior por una cerca.				
El área cuenta con paredes y pisos con materiales que permitan su fácil limpieza y sanitización.				
Cuenta con comederos para desarrollar el proceso de tal manera que el animal no se estrese.				
Cuenta con un depósito cercano de agua para el lavado de utensilios.				
Tiene un espacio para guardar los utensilios, el equipo de ordeño y para el almacenamiento de la leche de tamaño acorde con la producción.				
Cuenta con al menos un lavabo en el área de ordeño de tal manera que se garantice la higiene de las manos de los encargados durante el ordeño.				
Cuenta con un espacio para guardar los utensilios y el equipo de ordeño.				
Se cuenta con un recipiente para el depósito de leche no apta y su posterior descarte.				
El área de ordeño se mantiene libre de la presencia de animales no deseables (Cerdos, aves de corral, perro, gatos y otros).				
Corrales y comederos				
Los corrales se mantienen limpios y libres de acumulaciones de estiércol,				

lodo y cualquier otra materia no deseable como residuos de alimento, entre otras.				
Se realiza diariamente el lavado y sanitización de los comederos.				
Se encuentran libres de materia fecal y basura.				
En cada corral hay un área destinada únicamente para comederos.				
Se encuentra el alimento distribuido a lo largo del comedero.				
Los comederos usados para ofrecer forraje, concentrado y agua de tal manera que el alimento no sea desperdiciado y/o contaminado.				
Alimentación de las cabras				
Todo alimento que se introduzca a la granja está debidamente controlado y se conoce perfectamente su proveedor u origen.				
Los pastizales y forrajes que son consumidos por las cabras están retirados de focos de contaminación.				
Se cuenta con documentos que avalen la calidad y contengan la información de todo alimento.				
Se cuentan con especificaciones o listados de los aditivos, alimentos medicados u hormonas permitidas por SAGARPA.				
Durante el pastoreo hay una persona vigilado lo que ramonean las cabras.				
Se tiene un documento con la elaboración paso por paso del ensilado y aditivos permitidos en la fermentación.				
El Agua de la granja				
El agua es proveniente de alguna fuente natural o red de distribución				

de agua potable.				
Se cuenta con registros que demuestren la potabilidad del agua.				
La granja tiene una cisterna de almacenamiento de agua de clorada.				
Dispone de agua suficiente y apta para el uso que se destina, sin riesgo de deteriorar o poner en riesgo de contaminación a la leche.				
Cuenta con un sistema de drenajes seguro y entubado.				
Se reutiliza el agua proveniente de un enjuague para la limpieza de instalaciones.				
Equipo de ordeño y utensilios				
Dispone de equipos de ordeño mecánico y almacenamiento de leche fabricados con materiales que no tienen efectos tóxicos, ni transmiten contaminantes a la leche				
El tanque de almacenamiento de la leche y el equipo de enfriamiento son de acero inoxidable.				
El equipo de almacenamiento se encuentra sin grietas ni ranuras.				
El equipo se lava, sanitiza y se seca, antes y después de su uso sin excepciones.				
Se realiza una inspección de la limpieza de forma visual antes del uso del equipo de ordeño y almacenamiento.				
El equipo de ordeño cuenta con procedimientos de limpieza, desinfección y mantenimiento debidamente establecidos y documentados.				
Todos los utensilios que están en				

contacto directo con la leche son de fácil limpieza y desinfección.				
Se lleva un control y registro de la periodicidad de limpiezas de equipos y utensilios.				
Se cuenta con un control documental de los sanitizantes y soluciones limpiadoras utilizadas en la granja.				
Almacenamiento de la leche				
Presenta un tanque de almacenamiento de leche, exclusivo para este fin.				
Se toman las temperaturas del agua de enjuague del tanque.				
Se revisa periódicamente la temperatura de enfriamiento de la leche.				
Control de plagas y fauna nociva				
Se tiene implementado y documentado un programa para evitar la proliferación insectos, roedores y aves.				
Se inspecciona que no haya residuos de materia fecal de roedores y aves en instalaciones y corrales diariamente.				
Se cuenta con un medio físico de captura de roedores en las principales vías de acceso a la granja				
Se cuenta con mosquiteros o mallas que protejan las puertas y ventanas en el interior de la granja.				
Se revisan periódicamente esquinas de techos y paredes para evitar la proliferación de aves e insectos.				
Los productos químicos para el control de plagas (en caso de uso), están debidamente controlados e identificados.				
Higiene del personal				

Las normas del plantel lechero sobre higiene personal están documentadas y están adoptadas por todo el personal, incluyendo los visitantes.				
Estas están formuladas teniendo en cuenta el riesgo de contaminación del a leche.				
El personal de ordeño usa prendas limpias y apropiadas de uso única para el ordeño, de color blanco (preferentemente) para verificar a simple vista el nivel de limpieza				
El personal que labora en la granja se encuentra en un estado de salud íntegro y reporta cualquier síntoma de enfermedad.				
El personal lechero conoce las normas de higiene en la rutina de ordeño como lavado de manos y brazos.				
Cuentan con señalamientos que indiquen el lavado de manos y el uso de cubrebocas, cofia como mínimo, para su estancia en la granja.				
Se prohíbe el acceso a niños y mujeres embarazadas a corrales y almacén de materia prima.				
El personal que ingresa evita el uso de accesorios, maquillaje y otros al interior de la granja.				
Se provee constantemente al personal uniforme y demás aditamentos como cofias, mandiles y cubrebocas.				
Las personal conoce los principales procedimientos de buenas prácticas de ordeño.				
Es capacitado continuamente en temas de manejo animal, proceso de ordeño, higiene personal y hábitos higiénicos.				

El personal conoce los principales riesgos sobre el uso de equipo y herramientas de trabajo, como utensilios punzocortantes.				
El personal es constantemente capacitado sobre el manejo de residuos químicos, físicos y biológicos infecciosos.				
El personal es capacitado constantemente en el tipo de ordeña mecánica o manual.				

Anexo B. Formato de registro individual para caprinos

Número del animal _____	Nombre de la cabra o número del hato. _____	Fecha de llegada ___/___/___ (dd/mm/aa)	Ubicación en el establo: _____
		Criada del hato : <u>si</u> <u>no</u> Establo _____ de origen: _____	Responsable: _____
Raza:	Peso:	Compra externa: <u>si</u> <u>no</u>	Función:
Edad:		Nombre del	
Estado de salud:		vendedor: _____	
Observaciones:		Localización: _____	

(SAGARPA, 2014)

Anexo C. Principales síntomas de salud-listeriosis en cabras

Cabra saludable	Cabra enferma de listeriosis
<ul style="list-style-type: none"> - Se mantiene junto al rebaño, es inquieta y sólo se acuesta para rumiar y dormir. - Pelaje brillante y firme. - Ojos vivaces y brillosos, mucosas rosadas. - En buen estado y peso. - Leche dulce y agradable color y olor, sin aparición de coágulos. - No presenta incomodidad al momento de la ordeña ni al alimentarse 	<ul style="list-style-type: none"> - Se aparta y permanece acostada y oculta. - mucosas pálidas o amarillentas. - Se alimenta y rumia poco. - Presenta fiebre > 45°C y diarrea - Tiende a dar vueltas en círculos - Ladeo o torsión repentina de la cabeza - Presenta dolores e incomodidades al ordeñar, alimentarse etc. - Sangrado repentino en caso de estar preñada o lactando.

(Pedraza, 2011; Tenorio et al., 2015).

Anexo D. Registro para tratamiento de listeriosis en cabras

Síntomas o signos	Manejo del tratamiento (basado en la agudeza del problema)			
	Acción 1	Acción 2	Acción 3	Si no hay mejora en la condición hacer lo siguiente:
Ejemplo: <i>septicemia</i>				
Tambaleos, mareos, depresión fiebre, debilidad, diarrea	Aislar el animal urgentemente, medir signos vitales. temperatura > 45°C	Administrar una dosis del antibiótico <i>Clortetraciclina</i> Vía intravenosa Dosis 10 mg / kg de peso	Aumentar la dosis del fármaco, en caso de persistir los síntomas	Cambio de tratamiento

(SAGARPA, 2014; Díaz et al, 2015)

Anexo E. Formato para el registro de alimentos para el ganado caprino

Fecha de recepción del alimento	Ejemplo: 10-11-2016	
Fecha de preparación/ofrecido como alimento	Ejemplo: 15-11-2016	Observaciones:
Lista de ingredientes (señalados en la etiqueta)		
Alimentado con	Forraje	
	Concentrado	
	Ración	
Cantidad	Volumen_____ml.	
	Cantidad_____gr.	
Lugar del empaque		
Pruebas realizadas		
Persona responsable		

(FAO, 2010; SAGARPA, 2014)

Anexo F. Soluciones sanitizantes para ordeña

Hipoclorito de sodio	
Recomendado 50 ppm de cloro	
Temperatura: 24 °C	
Concentración	mL de hipoclorito/ml agua
6 %	0.8/1000
12%	0.5/1000
25%	0.3/1000
Solución de yodo	
Recomendado 25 ppm	
Temperatura de trabajo: 50°C	
Concentración	mL de yodo/mL de agua
25%	1/1000

(Marrufo, 2011).

Anexo G. Registro para la de limpieza y desinfección de equipo (ordeña mecánica)

Fecha	Inspección de nivel de limpieza y sanitización del equipo												Comentarios
	✓ Limpio X sucio												
	Tanque de almacenamiento				Equipo de ordeña								
	Aagitador	Salidas	Válvulas	Bombas	Agua de enjuague T°	Recipientes	Líneas	Mangueras	Soportes	Uniones	Baldes	Tapetes	
Ejemplo 15/12/16	✓	✓	✓	✓	25 °C	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	Hora limpieza 10:30

(SAGARPA, 2014).

Anexo H. Formato de registro de temperatura de la leche para almacenamiento

Rango de enfriamiento recomendado	Primera ordeña	Segunda Ordeña	
	Dentro de 2 hrs a temperatura de 1°C a 4 °C	Máxima temperatura cuando se mezclan las leches, dentro de 1 hr a temperatura de 1°C a 4 °C	
Pruebas mensuales		Fecha	
Termómetro calibrado			
Temperatura del tanque de almacenamiento de la leche			
	Inicial	Medio día	Tarde
Hora			
Temperatura (T° C)			
Responsable (firma)			
Comentarios			

(SAGARPA, 2014).