

Presencia y persistencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales de Jalisco, México

Presence and persistence of *Listeria* in four artisanal cheese plants in Jalisco, Mexico

Beatriz Teresa Rosas-Barbosa¹, Angélica Luis-Juan Morales¹, Ricardo Alaniz-de la O¹, Agustín Ramírez-Álvarez¹, Juan Paulo Soltero-Ramos^{1,2}, Rosalba de la Mora-Quiroz^{1,3}, Paul Martin⁴ y Christine Jacquet⁵

¹Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Departamento de Salud Pública, Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez No. 2100, La Venta del Astillero, Zapopan 44110, Jalisco, México. Tel: (33) 3777-1151; Fax: (33) 6682-0574.

²Morelos 20, C.P. 48150, Cuautla, Jalisco, México.

³Boehringer Ingelheim Vetmedica, Calle 30 No. 2614, Zona Industrial, Guadalajara 44940, Jalisco, México.

⁴Laboratoire des *Listeria* - Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Dirección actual: Direction scientifique des laboratoires, Anses, 27-31 avenue du General Leclerc, 94701 - Maisons- Alfort.

⁵Laboratoire des *Listeria* - Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France. Dirección actual: 12 rue de la Convention, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France.

✉ beatrizr@cucba.udg.mx
brbrosas@gmail.com

Citar

Resumen

Con el propósito de determinar la presencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales (A, B, C y D) productoras de quesos blandos Adobera, Fresco, Panela y Requesón, se colectaron 392 muestras a partir de leche cruda, cuajo, cuajada, quesos, equipos, superficies, piso, escobas y cepillos empleados para la limpieza, durante un período de 21 meses comprendidos de febrero 1999 a octubre del 2000. El aislamiento e identificación de *Listeria* se basó en las metodologías descritas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos de Norteamérica (Food and Drug Administration, FDA) y US Department of Agriculture (USDA), respectivamente. Se encontró que la frecuencia de *Listeria* por quesería fue, en A: 55 %, B: 33 %, C: 26 % y D: 7 %. Las superficies, el piso y los enseres de limpieza tuvieron los mayores porcentajes de muestras positivas. Las especies aisladas fueron: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. ivanovii*. Once (18 %) de las 59 muestras de queso procedentes de las queserías A y C, fueron positivas a *Listeria monocytogenes* que significó una fuente de infección para los consumidores. En la quesería A, se encontraron los serovares 1/2a, 1/2b, 1/2 inmóvil y 4 d. Los perfiles de macrorrestricción de DNA del serotipo 1/2b

mostraron 3 patrones estrechamente relacionados, uno de ellos se recuperó durante un período de 21 meses. En la planta C sólo se aisló el serovar 4b identificándose 4 patrones de DNA, uno de los cuales estuvo presente por un período de 15 meses. *L. innocua* fue la única especie encontrada en la quesería B. La baja frecuencia de *Listeria* en la quesería D se relacionó con el uso de agua hirviendo o suero calentado a 90 °C para limpiar pisos, equipos y superficies.

Palabras clave: Adobera, Panela, Requesón, contaminación.

Abstract

In order to determine the presence of *Listeria* in four artisanal dairies (A, B, C, D) that produce soft cheeses called Adobera, Fresco, Panela and Requesón, 392 samples were collected from raw milk, rennet curd, cheese equipment, surfaces, brooms, and brushes used for cleaning, over a 21-month period from February 1999 to October 2000. Isolation and identification of *Listeria* was conducted following the methodologies described by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) and Department of Agriculture (USDA), respectively. Findings showed that the frequency of *Listeria* per dairy was: Plant A: 55 %; B: 33 %; C: 26 %; and D: 7 %. Surfaces, floor and cleaning uten-

sils had the highest percentages of positive samples. The species isolated were: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, and *L. ivanovii*. Eleven (18 %) of 59 cheese samples were positive for *Listeria*, and cheeses from Plants A and C represented sources of *L. monocytogenes* infection in consumers. *L. monocytogenes* was isolated at two plants. At one (A), *L. monocytogenes* serovars 1/2a, 1/2b, 1/2 non-motile, as well as 4b were identified. DNA macro-restriction profile analysis showed three clusters for *L. monocytogenes* serovar 1/2b, of which one was recovered throughout the 21-month period.

At the other plant (C) only *L. monocytogenes* serovar 4b was identified. Four clusters were identified by DNA macro-restriction profile analysis, of which one was present throughout a 15-month period. *L. innocua* was the only species found at Plant B. The low frequency of *Listeria* at Plant D was likely related to the cleaning practice of using boiling water or whey heated to 90 °C to clean floors, equipment and surfaces.

Key words: *Adobera* cheese, *Panela* cheese, *Whey* cheese, contamination.

Introducción

Listeria es un género de bacterias gram-positivas, psicrotóficas no formadoras de esporas cuyo hábitat natural incluye la vegetación en descomposición, el suelo, agua y heces (Seeliger & Jones 1986). *Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista causante de la listeriosis, enfermedad rara pero severa que con frecuencia es letal (Wing & Gregory 2002). En los Estados Unidos de Norteamérica, por ejemplo, *L. monocytogenes* causa el 19 % de las muertes asociadas al consumo de alimentos (Scallan *et al.* 2011), mientras que los costos anuales estimados de secuelas de listeriosis en recién nacidos ascienden a 16 millones de dólares y los de listeriosis aguda oscilan entre los 187 a 219 millones de dólares (Buzby *et al.* 1996). En México, la listeriosis no es una enfermedad de reporte obligatorio (Secretaría de Salud 2013), sin embargo, de 1960 a 2011, se reportaron 60 casos (Barriga *et al.* 1981; Solorzano-Santos *et al.* 1989; Bonfil *et al.* 1990; Escárcega *et al.* 1999; Montes *et al.* 1999; Barriga *et al.* 2009; Otero 2011). En catorce de ellos los aislamientos fueron serotipificados siendo el serotipo 4b el responsable de 13 casos (58 %) que estuvieron relacionados con el binomio madre-recién nacido (Barriga *et al.* 1981, Bonfil *et al.* 1990).

Introduction

Listeria is a gram-positive, non-spore forming, psychrotrophic bacterium whose natural habitat includes decayed vegetation, soil, water and feces (Seeliger & Jones 1986). *Listeria monocytogenes* is a major opportunistic pathogen that causes a severe and often lethal disease (Wing & Gregory 2002). In the United States, *L. monocytogenes* causes 19 % of deaths associated with food consumption (Scallan *et al.* 2011). The annual estimated cost of listeriosis sequelae in newborns is 16 million U.S. dollars, while the costs of acute illnesses caused by foodborne listeriosis range from 186 to 219 million dollars (Buzby *et al.* 1996). In Mexico, there is no mandatory reporting of listeriosis as a communicable disease (Secretaría de Salud 2013), but from 1960 to 2011, 60 cases were identified (Barriga *et al.* 1981; Solorzano-Santos *et al.* 1989; Bonfil *et al.* 1990; Escárcega *et al.* 1999; Montes *et al.* 1999; Barriga *et al.* 2009; Otero 2011). In 14 cases, the isolates were serotyped: serovar 4b was responsible for 12 cases, whereas 7 (58 %) involved *L. monocytogenes* serovar 4b, and were related to mothers, newborns and stillbirths (Barriga *et al.* 1981; Bonfil *et al.* 1990).

La investigación de brotes y casos esporádicos de listeriosis transmitida por alimentos muestra que la contaminación de los mismos en las empresas donde se elaboran es un elemento decisivo para la ocurrencia de la enfermedad (Craig *et al.* 1997, Linnan *et al.* 1988, McLauchlin *et al.* 1990). En los últimos 30 años, se ha observado una relación entre la aplicación de medidas para el control de *Listeria monocytogenes* en la industria de alimentos, con una reducción en la frecuencia de alimentos contaminados y de casos de listeriosis (Goulet *et al.* 2001).

Puesto que todas las especies de *Listeria* tienen el mismo hábitat, el aislamiento de cualquiera de ellas puede indicar la posible presencia de *Listeria monocytogenes* (Feresu & Jones 1988). No obstante, en fábricas de alimentos se han encontrado una sola especie de *Listeria*, la persistencia de ciertos serovares de *L. monocytogenes*, o la implantación de clonas en ciertas áreas de la fábrica (Gravani 1999, Jacquet *et al.* 1993, Tompkin 2002). La presencia de *Listeria* en lácteos que se producen a escala industrial se conoce con amplitud (Cox *et al.* 1989, Pritchard *et al.* 1994), pero hasta la fecha no se cuenta con información sobre la presencia de *Listeria* en la producción artesanal de quesos en México.

En el estado de Jalisco, que se localiza en la región occidental de México, los quesos blandos: Panela, Fresco y Adobera, se elaboran de manera artesanal con leche cruda. El queso Panela se moldea en recipientes confeccionados con plantas de la misma familia botánica del bambú, y que se conocen como “carrizo” (*Arundo donax* L.) y “otate” (*Chusquea acuminata* Döll). El queso Fresco se obtiene al moler la cuajada y adquirir su forma mediante el uso de moldes de metal. El proceso de elaboración del queso Adobera requiere que la cuajada se conserve a temperatura ambiente de 24 a 48 h, luego se muele y coloca en moldes rectangulares de madera. El Requesón se produce de manera artesanal a partir de suero hirviendo al que se le añade otro ya fermentado como agente acidificante para aglutinar y precipitar las partículas pequeñas de cuajada, con lo que se obtiene una masa blanda (figura 1).

En un estudio previo, se aisló *Listeria* a partir de quesos blandos producidos en una población

Studies of outbreaks and sporadic foodborne listeriosis have shown that contamination of foods in facilities has been a decisive element in the occurrence of the disease (Craig *et al.* 1997; Linnan *et al.* 1988; McLauchlin *et al.* 1990). In the past 30 years, a relation has been observed between the application of preventive measures for controlling *Listeria monocytogenes* in the food industry, reducing amounts of contaminated food, and the incidence of listeriosis (Goulet *et al.* 2001).

Because all *Listeria* species can share the same habitat, isolation of *Listeria* sp. may indicate the possible presence of *Listeria monocytogenes* in the same location (Feresu & Jones 1988). However, a single species of *Listeria*, the persistence of certain serovars of *L. monocytogenes*, or the implantation of clones in some areas has been found in food-processing facilities (Gravani 1999; Jacquet *et al.* 1993; Tompkin 2002). Although the occurrence of *Listeria* in dairy production has been widely reported, no information on its presence in artisanal cheese production in Mexico is currently available (Cox *et al.* 1989; Pritchard *et al.* 1994).

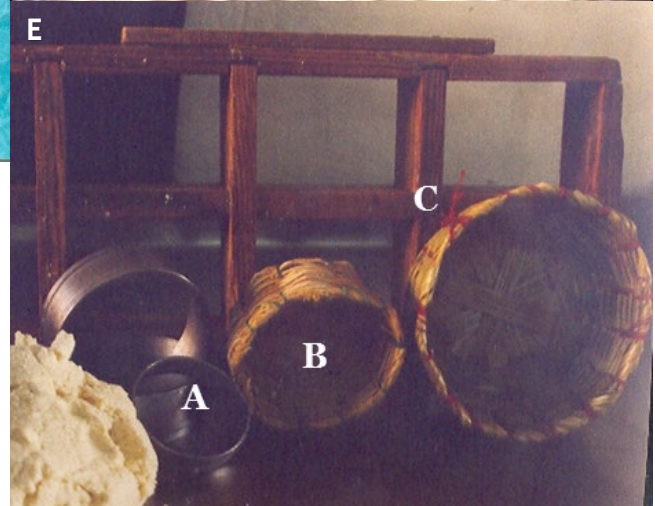
In the state of Jalisco in western Mexico, soft artisanal cheeses called *Panela*, *Fresco* and *Adobera* are elaborated from fresh raw milk. *Panela* is produced by placing curd in molds made from plants similar to bamboo known as *carrizo* (*Arundo donax* L.) or *otate* (*Chusquea acuminata* Döll). *Fresco* cheese is obtained by grinding the curd and then placing it in metal molds, while the process for elaborating *Adobera* requires that the curd sit for 24–48 hours at room temperature before being ground and placed in wooden molds. *Requesón*, finally, is obtained by boiling whey and then adding fermented whey as an acidifying agent to agglutinate and precipitate small particles of curd (figure 1).

Listeria was isolated from soft artisanal cheeses produced in a town in Jalisco (Luis Juan-Morales 1994), so the objective of the present study was to determine the occurrence, point-sources and possible persistence of *Listeria* in four artisanal cheese plants in that state.



Figura 1. Moldes y quesos blandos artesanales: **A** Fresco, **B** Panela, **C** Adobera, **D** Requesón y **E** moldes.

Figure 1. Molds and artisanal soft cheeses. **A** Fresco, **B** Panela, **C** Adobera, **D** Requeson and **E** molds.



de Jalisco, México (Luis-Juan Morales 1994) por ello, el objetivo de esta investigación fue determinar la presencia, fuentes y persistencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales.

Material y métodos

Queserías: Se identificaron 58 queserías artesanales en un municipio de Zapotlanejo, Jalisco, de ellas, se seleccionaron cuatro bajo los siguientes criterios: 1) el queso que se produce en esas plantas se comercializa en Guadalajara, Jalisco; 2) se ubican en calles distintas, con una distancia mínima entre ellas de 400 m; 3) el procedimiento para la elaboración de los quesos es idéntico, así como el empleo de equipos similares; 4) se trabajan los siete días de la semana; 5) no existe relación entre propietarios, empleados o proveedores de leche (lecheros) de las queserías seleccionadas.

Cada quesería se localizó en diferente punto cardinal: “A” al norte, “B” al oeste, “C” al sur y “D” al este. Las queserías A y B procesaban menos de 300 litros de leche por día, las plantas C y D de 300 a 800 litros por día. La A almacenaba el queso en un refrigerador de 35 pies cúbicos, la B en uno de 25, la C en una pequeña cámara de refrigeración y la planta D en un cuarto refrigerado.

Se colectaron 392 muestras en un período de 21 meses (cuadros 2–6), iniciando en febrero y terminando en octubre del siguiente año. Cada quesería fue visitada de 10 a 15 veces en diferentes días de la semana, para tomar muestras y observar los procesos de elaboración, almacenamiento y limpieza. El intervalo mínimo entre una visita y otra fue de 3 semanas. A partir de los ingredientes, medio ambiente, equipo y etapas de elaboración de los quesos se identificaron 24–25 puntos que fueron muestreados en 4 ocasiones obteniéndose de 95 a 100 muestras por quesería, con las excepciones que se muestran en el cuadro 1.

Hubo situaciones que limitaron la recolección simultánea de muestras de todos los puntos, por ejemplo ausencia de queso en refrigeradores o que el punto presentara condiciones diferentes a

Material and methods

Cheese plants: Researchers identified 58 artisanal cheese plants in a cheese-producing town in Jalisco, from which 4 were selected to conduct this study under the following criteria: 1) cheese produced in the plants had to be sold in markets in Guadalajara; 2) the plants had to be located on different streets with a minimum separation of 400 m; 3) plants had to have identical cheese-processing procedures and similar equipment; 4) production had to be continuous during the week; and, 5) no relationships among owners, employees or milkmen at the selected plants were allowed. Each plant was located at one of the cardinal points: “A”, north, “B”, west, “C”, south, and “D”, east. Plants A and B processed less than 300 liters of milk per day, while C and D processed 300–800 liters/day. Plant A stored cheese in a 35-sq. ft. refrigerator; Plant B in a 25-sq. ft. refrigerator; Plant C in a small refrigeration chamber; and Plant D in a refrigerated room.

A total of 392 samples were collected over a period of 21 months (tables 2–6) that began in February and ended in October of the following year. Each plant was visited 10–15 times on different days to take samples and make observations on the production process, storage facilities and cleaning procedures. Each plant had 24–25 sampling sites that covered the ingredients used, the environment, equipment, and every stage of artisanal cheese elaboration. At each plant, 95–100 samples were collected. Each sampling site was sampled 4 times, except as shown in table 1. If a site was sampled 4 times on the first 4 visits (one sample per visit) it was not tested further. Other scenarios limited our possibilities to draw samples from specific sampling sites during our visits; for example, when there was no cheese in the refrigerators, or the sampling site had distinct conditions from those at the equivalent site at another plant, or from the first visit to that site. In such cases no sampling was performed. The period established to sample the same point was at least 3 weeks. Samples were refrigerated, transported to the laboratory, and processed within 24 h after collection.

Milk: 500 ml of raw milk from each can to be processed was pooled to obtain a 4–10-liter

Cuadro 1. Puntos muestreados en más o menos de 4 ocasiones.

Quesería	Punto	Número de veces muestreado	Situación
A	Chiquigüite	5	Muestreado una vez más para confirmar persistencia de contaminación en este equipo
	Cuajada para queso Adobera	3	Por bajo volumen de producción durante 12 meses, los propietarios no permitieron coleccionar otra muestra
	Saco de plástico para escurrir cuajada	0	Inexistente durante el período de muestreo
B	Utensilio para mezclar leche y cuajo	3	Descontinuaron su empleo durante 6 meses
	Cuajada para queso Adobera	3	Por bajo volumen de producción durante 7 meses los propietarios no permitieron coleccionar otra muestra
D	Tela para moldear queso adobera	3	En el segundo año no se pudo encontrar una tela similar a la que utilizaban, para reponer la que se recolectaba

Table 1. Sampled points more or less than 4 times.

Cheese plant	Point	Number of times sampled	Situation
A	Chiquigüite	5	Sampled again to confirm persistence of contamination in this equipment
	Curd for Adobera cheese	3	For low volume production for 12 months, the owners allowed not collect another sample
	Plastic sack for drain curd	0	Nonexistent during the sampling period
B	Utensil used to mix milk with rennet	3	Use was discontinued for 6 months
	Curd for Adobera cheese	3	Due to low production during 7 months, the owners did not permit collection of another sample
D	Cloth for molding Adobera cheese	3	In the second year, no cloth similar to the one they had been using could be found to replace the one collected

Cuadro 2. Frecuencia de *Listeria* en cuatro queserías artesanales.

Categoría	Quesería A Positivas* /Total (% Positivas)	Quesería B Positivas /Total (% Positivas)	Quesería C Positivas* /Total (% Positivas)	Quesería D Positivas /Total (% Positivas)
Ingredientes	0/8 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)
Cuajadas	3/7 (43)	0/7 (0)	0/8 (0)	1/8 (12)
Quesos	8/15 (53)	0/16 (0)	3/12 (25)	0/16 (0)
Equipo	24/41 (58)	17/43 (40)	11/44 (25)	1/43 (2)
Superficies en contacto con el alimento [†]	8/12 (66)	5/12 (42)	7/12 (58)	3/12 (25)
Pisos y cepillos	9/12 (75)	10/12 (83)	5/12 (42)	2/12 (17)
Total	52/95 (55)	32/98 (33)	26/100 (26)	7/99 (7)

* Muestras positivas a *Listeria*. † Ingredientes o quesos en diferentes etapas de elaboración y conservación.

Table 2. Frequency of *Listeria* in artisanal cheese plants.

Category	Plant A Positive*/Total (% Positive)	Plant B Positive*/Total (% Positive)	Plant C Positive*/Total (% Positive)	Plant D Positive*/Total (% Positive)
Ingredients	0/8 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)	0/8 (0)
Curds	3/7 (43)	0/7 (0)	0/8 (0)	1/8 (12)
Cheeses	8/15 (53)	0/16 (0)	3/12 (25)	0/16 (0)
Equipment	24/41 (58)	17/43 (40)	11/44 (25)	1/43 (2)
Food contact surfaces†	8/12 (66)	5/12 (42)	7/12 (58)	3/12 (25)
Floor and brushes	9/12 (75)	10/12 (83)	5/12 (42)	2/12 (17)
Total	52/95 (55)	32/98 (33)	26/100 (26)	7/99 (7)

* *Listeria* positive samples. † Ingredients or cheeses in different steps of elaboration and conservation.

las encontradas en la primera visita o con las otras queserías. Las muestras fueron transportadas en refrigeración y procesadas dentro de las 24 h posteriores a su recolección.

Leche: De cada cántara, se recolectaron quinientos mililitros de leche para obtener una muestra compuesta de 4 a 10 litros, a partir de la cual se tomaron 250 ml y la leche restante fue filtrada a través de una torunda de Moore estéril, consistente en una pieza de gasa de algodón de 120 cm de largo por 15 cm de ancho doblada 8 veces (Wells 1971). Se analizaron por separado la torunda de Moore y 25 ml de la muestra de 250 ml.

Cuajo: De la botella que se utilizó el día de la visita se trasvasaron 50 ml a un frasco estéril.

Cuajadas: Con guante estéril se tomaron porciones de diferentes recipientes hasta completar 250 g que se colocaron en bolsas de plástico nuevas, analizándose 25 g de cada tipo de cuajada.

Quesos: Se colectaron muestras compuestas (pool) de 800 g a partir de rebanadas tomadas de 4 a 8 piezas de los quesos Adobera, Panela y Fresco. El peso promedio de cada pieza de queso fue de 100 a 1400 g. Como el Requesón no es un queso moldeado, la muestra compuesta se hizo al tomar porciones de la masa de diferentes recipientes. El volumen de la muestra compuesta se estableció conforme al cuarto criterio del

composite sample. Samples of 250 ml were then obtained from each composite sample. The remaining milk was filtered through a Moore's swab, a piece of cotton gauze 120 cm × 15 cm folded eight times (Wells 1971). Twenty-five milliliters from the 250-ml composite sample and the Moore's swabs were analyzed separately.

Rennet: From bottle to be used the day of the visit to a sterile 50 ml vial were transferred.

Curdled: Using sterile glove portions of different containers were taken to complete 250 g which were placed in new plastic bags, analyzing 25 g of each type of curd.

Cheeses: Composite 800-g samples were collected from single slices of 4-8 pieces of *Adobera*, *Panela* and *Fresco* cheese. Because *Requesón* is a non-molded whey cheese, no slices were made to obtain a composite sample of this product. The weight range of each slice was 100-1400 g. The volume of the composite sample was determined according to the 14th criteria of the ICMF for *Listeria* sampling in dairy products (Grace 1992), which stipulates a 750-g volume for the composite sample. This number was rounded to 800 g in order to take similar portions from all cheeses (figure 1), and 25-g samples from each composite sample were analyzed.

Cuadro 3. Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería A.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año			Positivas/ Total
		Feb	Abr	Jun	Ago	Sep	Dic	Feb	Sep	Oct	
Ingredientes	Leche cruda	o*	o	— [†]	o	o	—	—	—	◊ [‡]	0/4
	Cuajo	—	—	o	—	o	o	—	◊	◊	0/4
Cuajadas	Cuajada para quesos Panela y Fresco	—	o	L.m1/2b [§]	o	o	—	—	◊	◊	1/4
	Cuajada para queso Adobera	—	o	L.m1/2a	o	o	o	o	o	L.m1/2b, L.welshimeri [¶]	2/3
Quesos	Adobera	o	o	L.m1/2b	—	o	o	L.m1/2b	L.m1/2b	◊	3/4
	Fresco	—	o	—	o	o	o	—	L.m1/2b	◊	1/4
	Panela	L.m1/2a	L.m1/2a	L.m1/2b	o	o	—	◊	◊	◊	3/4
	Requesón	o	—	—	o	o	o	L.m1/2b	o	o	1/3
Equipo	Utensilio para mezclar leche y cuajo	—	—	—	—	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Molino	L.m1/2a	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m1/2b, L.welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
	Equipo para extracción del suero	o	L.m1/2b	L.m1/2b	o	o	L.m1/2b	o	L.m1/2b	◊	4/4
	Recipientes para cuajar	—	L.m1/2b	—	—	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Tela para filtrar leche	—	o	o	L.m1/2b, L.welshimeri	—	L.m1/2b	◊	◊	◊	2/4
	Tela para moldear queso Adobera	—	o	o	o	—	o	L.m1/2b	L.m4d	◊	2/4
	Moldes de otate para queso Panela	L.m1/2a	L.m1/2b	L.m1/2b	—	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
	Moldes de madera para queso Adobera	—	L.m1/2a	—	L.m1/2b	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Moldes de metal para queso Fresco	o	o	—	—	o	—	L.m1/2b	◊	◊	1/4
	Chiquigüite [#]	L.m1/2b	o	L.m1/2b	L.m1/2 inmóvil, L.innocua	o	L.m1/2b	L.m1/2b	◊	◊	5/5
Superficies en contacto con alimento	Manos	L.m1/2b	o	—	o	o	—	—	◊	◊	1/4
	Superficies área procesamiento	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m1/2 inmóvil	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
	Refrigerador	L.m1/2b	—	L.m1/2b	L.m1/2b	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
Piso y cepillos	Piso del área de procesamiento	—	—	—	L.innocua	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cepillo para limpiar superficies y equipo	o	L.m1/2a	L.m1/2b, L.innocua	L.m1/2b	o	L.m1/2b	◊	◊	◊	4/4
	Escoba	L.m1/2a, L.innocua	L.m1/2b, L.innocua	L.m1/2b	o	o	L.m1/2b	◊	◊	◊	4/4
Total de Muestras Positivas		8	9	12	8	0	5	5	4	1	52/95

* o No muestreado. † _ Negativo. ‡ ◊ Punto que ya fue muestreado 4 veces. ¶ L.m. *Listeria monocytogenes*. § Catalasa negativa. || Pequeños moldes cilíndricos hechos con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L. # Cesto cónico de aproximadamente 60 cm de diámetro, fabricado con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L.

Table 3. Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant A.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year			Positive/ Total
		Feb	Apr	Jun	Aug	Sep	Dec	Feb	Sep	Oct	
Ingredients	Raw milk	o*	o	—†	o	o	—	—	—	o‡	0/4
	Rennet	—	—	o	—	o	o	—	o	o	0/4
Curds	Curd for Panela and Fresco cheeses	—	o	L.m1/2b§	o	o	—	—	o	o	1/4
	Curd for Adobera cheese	—	o	L.m 1/2a	o	o	o	o	o	L.m 1/2b, L. welshimeri¶	2/3
Cheeses	Adobera	o	o	L.m1/2b	—	o	o	L.m1/2b	L.m1/2b	o	3/4
	Fresco	—	o	—	o	o	o	—	L.m1/2b	o	1/4
	Panela	L.m 1/2a	L.m1/2a	L.m1/2b	o	o	—	o	o	o	3/4
	Requeson	o	—	—	o	o	o	L.m1/2b	o	o	1/3
Equipment	Utensil for mixing milk and rennet	—	—	—	—	o	o	o	o	o	0/4
	Mill	L.m 1/2a	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m 1/2b, L. welshimeri	o	o	o	o	o	4/4
	Equipment for whey extraction	o	L.m1/2b	L.m1/2b	o	o	L.m1/2b	o	L.m1/2b	o	4/4
	Curdling vats	—	L.m1/2b	—	—	o	o	o	o	o	1/4
	Cloth for Filter Milk	—	o	o	L.m 1/2b, L. welshimeri	—	L.m1/2b	o	o	o	2/4
	Cloth for Molding Adobera Cheese	—	o	o	o	—	o	L.m1/2b	L.m 4d	o	2/4
	Otate Molds for Panela Cheese	L.m 1/2a	L.m1/2b	L.m1/2b	—	o	o	o	o	o	3/4
	Wood Molds for Adobera Cheese	—	L.m1/2a	—	L.m1/2b	o	o	o	o	o	2/4
	Metal Molds for Fresco Cheese	o	o	—	—	o	—	L.m1/2b	o	o	1/4
	Otate Basket (Chiquigüite) #	L.m1/2b	o	L.m1/2b	L.m 1/2 inmóvil, L.innocua	o	L.m1/2b	L.m1/2b	o	o	5/5
Food contact surfaces	Hands	L.m1/2b	o	—	o	o	—	—	o	o	1/4
	Processing surfaces	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m1/2b	L.m 1/2 inmóvil	o	o	o	o	o	4/4
	Refrigerator	L.m1/2b	—	L.m1/2b	L.m1/2b	o	o	o	o	o	3/4
Floor and brushes	Processing area floors	—	—	—	L. innocua	o	o	o	o	o	1/4
	Brush for cleaning surfaces and equipment	o	L.m1/2a	L.m 1/2b, L.innocua	L.m1/2b	o	L.m1/2b	o	o	o	4/4
	Broom	L.m 1/2a, L.innocua	L.m 1/2b, L.innocua	L.m1/2b	o	o	L.m1/2b	o	o	o	4/4
Total Positive Samples		8	9	12	8	0	5	5	4	1	52/95

* o No sampled. † — Negative. ‡ o Point sampled 4 times, and then no sampled again. ¶ L.m. *Listeria monocytogenes*. § Catalase negative. || Little cylindrical molds made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L. # Conic basket with diameter aproximate of 60 cm, made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L.

Cuadro 4. Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería B.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año					Positivas/ Total	
		Mar	May	Jun	Aug	Sep	Dic	Feb	Mar	Abr	May	Sep		
Ingredientes	Leche cruda	o*	†	–	–	o	–	‡	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Cuajadas	Cuajada para quesos Panela y Fresco	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajada para queso Adobera	o	–	–	o	o	o	–	o	o	o	o	o	0/3
Quesos	Adobera	o	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	o	–	–	–	o	o	o	–	◊	◊	◊	◊	0/4
	Panela	–	–	o	o	o	o	o	–	o	–	◊	◊	0/4
	Requesón	–	–	–	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Equipo	Saco de polietileno para drenar (escurrir) la cuajada	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Utensilio para mezclar leche y cuajo	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	o	o	–	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	2/3
	Molino	–	–	–	–	o	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Equipo para extracción del suero	o	o	–	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	◊	◊	3/4
	Recipientes para cuajar	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
	Tela para filtrar leche	o	o	o	–	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Tela para moldear queso Adobera	o	–	o	–	o	o	o	o	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	1/4
	Moldes de otate para queso Panela	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	o	o	–	o	–	–	◊	◊	◊	◊	2/4
	Moldes de madera para queso Adobera	o	o	–	–	o	o	–	o	–	◊	◊	◊	0/4
	Moldes de metal para queso Fresco	o	o	–	–	o	o	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	1/4
Chiquigüite*	o	o	–	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	◊	◊	3/4	
Superficies en contacto con alimento	Manos	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Superficies área procesamiento	–	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
	Refrigerador	<i>L. innocua</i>	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
Piso y Cepillos	Piso del área de procesamiento	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
	Cepillo para limpiar superficies y equipo	o	<i>L. innocua</i>	–	–	o	o	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Escoba	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
Total de muestras positivas		5	6	5	7	0	0	4	1	0	3	1	32/98	

* o No muestreado. † _ Negativo. ‡ ◊ Punto que ya fue muestreado 4 veces. || Pequeños moldes cilíndricos hechos con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L. # Cesto cónico de aproximadamente 60 cm de diámetro, fabricado con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L.

Table 4. Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant B.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year					Positive/ Total		
		Mar	May	Jun	Aug	Sep	Dec	Feb	Mar	Apr	May	Sep			
Ingredients	Raw milk	o*	†	–	–	o	–	‡	◊	◊	◊	◊	◊	0/4	
	Rennet	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4	
Curds	Curd for Panela and Fresco cheeses	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4	
	Curd for Adobera cheese	o	–	–	o	o	o	–	o	o	o	o	o	0/3	
Cheeses	Adobera	o	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4	
	Fresco	o	–	–	–	o	o	o	–	◊	◊	◊	◊	0/4	
	Panela	–	–	o	o	o	o	o	–	o	–	◊	◊	0/4	
	Requeson	–	–	–	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4	
Equipment	Polyethylene sack to drain curd	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4	
	Utensil for mixing milk and rennet	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	o	o	o	o	–	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	2/3	
	Mill	–	–	–	–	o	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4	
	Equipment for whey extraction	o	o	–	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	3/4	
	Curdling vats	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4	
	Cloth for Filter Milk	o	o	o	–	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	1/4	
	Cloth for Molding Adobera Cheese	o	–	o	–	o	o	o	o	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	1/4	
	Otate Molds for Panela Cheese	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	o	o	–	o	–	–	–	◊	◊	◊	2/4	
	Wood Molds for Adobera Cheese	o	o	–	–	o	o	–	o	–	–	◊	◊	0/4	
	Metal Molds for Fresco Cheese	o	o	–	–	o	o	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	1/4	
	Otate Basket (Chiquigüite)*	o	o	–	<i>L. innocua</i>	o	o	<i>L. innocua</i>	o	o	o	<i>L. innocua</i>	◊	3/4	
	Food contact surfaces	Hands	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
		Processing surfaces	–	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
Refrigerator		<i>L. innocua</i>	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4	
Floor and brushes	Processing area floors	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4	
	Brush for cleaning surfaces and equipment	o	<i>L. innocua</i>	–	–	o	o	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	2/4	
	Broom	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4	
Total Positive Samples		5	6	5	7	0	0	4	1	0	3	1	32/98		

* o No sampled. † Negative. ‡ ◊ Point sampled 4 times, and then no sampled again. || Little cylindrical molds made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L. # Conic basket with diameter approximate of 60 cm, made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L.

Cuadro 5. Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería C.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año					Positivas/ Total	
		May 3	May 24	Jun	Ago	Sep	Dic	Mar	Abr	May	Sep	Oct		
Ingredientes	Leche cruda	– [†]	–	–	–	◊ [‡]	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Cuajadas	Cuajada para quesos Panela y Fresco	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajada para queso Adobera	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Quesos	Adobera	–	–	–	o [‡]	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	–	–	o	o	o	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Panela	–	L.m 4b [†]	o	o	o	L. m 4b, L. innocua, L. welshimeri	o	o	o	L. m 4b, L. welshimeri	◊	◊	3/4
	Requesón	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Equipo	Saco de polietileno para drenar (escurrir) la cuajada	o	o	o	o	o	o	–	–	–	o	L. m no serotipificada	◊	1/4
	Utensilio para mezclar leche y cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Molino	–	L.m 4b	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Equipo para extracción del suero	–	–	–	o	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Recipientes para cuajar	L. seeligeri	–	–	L. m serotipo no designado	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Tela para filtrar leche	o	o	o	o	–	L. m 4b, L. ivanovii	o	–	o	L. m 4b	◊	◊	2/4
	Tela para moldear queso Adobera	o	o	o	o	–	L. m 4b, L. innocua	o	–	o	–	◊	◊	1/4
	Moldes de otate para queso Panela	–	L. m 4b	–	L. m 4b, L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Moldes de madera para queso Adobera	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Moldes de metal para queso Fresco	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Chiquigüite #	o	–	–	L. m 4b, L. innocua, L. welshimeri	o	o	L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	2/4	
Superficies en contacto con alimento	Manos	–	L. m 4b	o	L. m 4b	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Superficies área procesamiento	–	–	–	L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Refrigerador	L. m 4b, L. innocua	L. m 4b, L. innocua, L. welshimeri	L. m 4b, L. innocua, L. welshimeri	L. m 4b, L. innocua, L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
Piso y Cepillos	Pisos de áreas de procesamiento y de refrigeración	–	–	–	L. m 4b	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cepillo para limpiar superficies y equipo	–	o	–	L. welshimeri	o	o	–	◊	◊	◊	◊	◊	1/4

Cuadro 5 (continuación). Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería C.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año					Positivas/ Total	
		May 3	May 24	Jun	Ago	Sep	Dic	Mar	Abr	May	Sep	Oct		
	Escoba	<i>L. seeligeri</i>	–	<i>L.m 4b, L. welshimeri</i>	<i>L. m 4b, L. innocua, L. welshimeri</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
Total de muestras positivas		3	5	2	9	0	3	1	0	0	2	1	26/100	

†_ Negativo. ‡◊ Punto que ya fue muestreado 4 veces. * o No muestreado. ¶ *L.m. Listeria monocytogenes*. || Pequeños moldes cilíndricos hechos con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L. # Cesto cónico de aproximadamente 60 cm de diámetro, fabricado con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L.

Table 5. Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant C.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year					Positive/ Total	
		May 3	May 24	Jun	Aug	Sep	Dec	Mar	Apr	May	Sep	Oct		
Ingredients	Raw milk	– [†]	–	–	–	◊ [‡]	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Rennet	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Curds	Curd for Panela and Fresco cheeses	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Curd for Adobera cheese	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Cheeses	Adobera	–	–	–	◊ [*]	◊	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	–	–	◊	◊	◊	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Panela	–	<i>L.m 4b</i> [¶]	◊	◊	◊	<i>L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri</i>	◊	◊	◊	<i>L.m 4b, L. welshimeri</i>	◊	◊	3/4
	Requeson	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Equipment	Polyethylene sack to drain curd	◊	◊	◊	◊	◊	◊	–	–	–	◊	<i>L.m not serotyped</i>	◊	1/4
	Utensil for mixing milk and rennet	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Mill	–	<i>L.m 4b</i>	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Equipment for whey extraction	–	–	–	◊	◊	◊	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Curdling vats	<i>L. seeligeri</i>	–	–	<i>L.m serovar undesignate</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Cloth for Filter Milk	◊	◊	◊	◊	–	<i>L.m 4b, L. ivanovii</i>	◊	–	◊	<i>L.m 4b</i>	◊	◊	2/4
	Cloth for Molding Adobera Cheese	◊	◊	◊	◊	–	<i>L.m 4b, L. innocua</i>	◊	–	◊	–	◊	◊	1/4
	Otate Molds for Panela Cheese	–	<i>L.m 4b</i>	–	<i>L.m 4b, L. welshimeri</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Wood Molds for Adobera Cheese	◊	–	–	–	◊	◊	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Metal Molds for Fresco Cheese	◊	–	–	–	◊	◊	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Otate Basket (Chiquigüite) [¶]	◊	–	–	<i>L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri</i>	◊	◊	<i>L. welshimeri</i>	◊	◊	◊	◊	◊	2/4	

Table 5 (continuation). Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant C.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year					Positive/ Total
		May 3	May 24	Jun	Aug	Sep	Dec	Mar	Apr	May	Sep	Oct	
Food contact surfaces	Hands	–	L.m 4b	o	L.m 4b	o	o	–	◊	◊	◊	◊	2/4
	Processing surfaces	–	–	–	L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Refrigerator	L.m 4b, L. innocua	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	L.m 4b, L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	4/4
Floor and brushes	Processing area floors	–	–	–	L.m 4b	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Brush for cleaning surfaces and equipment	–	o	–	L. welshimeri	o	o	–	◊	◊	◊	◊	1/4
	Broom	L. seeligeri	–	L.m 4b, L. welshimeri	L.m 4b, L. innocua, L. welshimeri	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	3/4
Total Positive Samples		3	5	2	9	0	3	1	0	0	2	1	26/100

* o No sampled. †_ Negative. ‡ ◊ Point sampled 4 times, and then no sampled again. ¶ L.m. *Listeria monocytogenes*. || Little cylindrical molds made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L. # Conic basket with diameter approximate of 60 cm, made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L.

Cuadro 6. Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería D.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año			Positivas/ Total		
		Abr	May	Jun	Ago	Sep	Dic	Mar	Abr	May		Sep	
Ingredientes	Leche cruda	–†	–	–	–	◊‡	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Cuajadas	Cuajada para quesos Panela y Fresco	–	–	–	L. innocua	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cuajada para queso Adobera	o*	–	–	o	o	o	–	–	◊	◊	◊	0/4
Quesos	Adobera	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	o	–	–	–	o	o	o	o	o	–	–	0/4
	Panela	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Requesón	o	–	–	o	o	–	–	◊	◊	◊	◊	0/4
Equipo	Saco de polietileno para drenar (escurrir) la cuajada	o	o	o	o	o	–	–	–	–	–	o	0/4
	Utensilio para mezclar leche y cuajo	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Molino	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Equipo para extracción del suero	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Recipientes para cuajar	–	–	–	L. innocua	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Tela para filtrar leche	–	o	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Tela para moldear queso Adobera	–	o	o	o	o	–	–	o	o	o	o	0/3
	Moldes de otatell para queso Panela	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Moldes de madera para queso Adobera	o	o	–	o	o	o	–	–	–	–	◊	0/4

Cuadro 6 (continuación). Distribución de aislamientos de *Listeria* en la quesería D.

Categoría	Punto de muestreo	Primer año						Segundo año			Positivas/ Total	
		Abr	May	Jun	Ago	Sep	Dic	Mar	Abr	May		Sep
Superficies en contacto con alimento	Moldes de metal para queso Fresco	o	o	–	–	o	o	o	–	–	◊	0/4
	Chiquigüite*	o	o	–	–	o	o	–	o	–	◊	0/4
	Manos	–	–	o	–	o	o	o	o	o	<i>L. innocua</i>	1/4
	Superficies área procesamiento	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Piso y Cepillos	Refrigerador	–	–	<i>L. innocua</i> , <i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	2/4
	Pisos de áreas de procesamiento y de refrigeración	–	–	<i>L. innocua</i>	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cepillo para limpiar superficies y equipo	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	0/4
	Escoba	–	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
Total de muestras positivas		0	0	2	4	0	0	0	0	0	1	7/99

†_ Negativo. ‡ ◊ Punto que ya fue muestreado 4 veces. * o No muestreado. || Pequeños moldes cilíndricos hechos con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L. # Cesto cónico de aproximadamente 60 cm de diámetro, fabricado con tallos de *Chusquea acuminata* Döll o *Arundo donax* L.

Table 6. Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant D.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year			Positive/ Total	
		Apr	May	Jun	Aug	Sep	Dec	Mar	Apr	May		Sep
Ingredients	Raw milk	– [†]	–	–	–	◊ [‡]	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Rennet	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
Curds	Curd for Panela and Fresco cheeses	–	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Curd for Adobera cheese	o [*]	–	–	o	o	o	–	–	◊	◊	0/4
Cheeses	Adobera	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Fresco	o	–	–	–	o	o	o	o	o	–	0/4
	Panela	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Requesón	o	–	–	o	o	–	–	◊	◊	◊	0/4
Equipment	Polyethylene sack to drain curd	o	o	o	o	o	–	–	–	–	o	0/4
	Utensil for mixing milk and rennet	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Mill	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Equipment for whey extraction	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Curdling vats	–	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Cloth for Filter Milk	–	o	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Cloth for Molding Adobera Cheese	–	o	o	o	o	–	–	o	o	o	0/3
	Otate Molds for Panela Cheese	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4

Table 6 (continuation). Distribution of *Listeria* isolates from artisanal cheese plant D.

Category	Sampling Site	First Year						Second Year			Positive/ Total	
		Apr	May	Jun	Aug	Sep	Dec	Mar	Apr	May		Sep
Food contact surfaces	Wood Molds for Adobera Cheese	o	o	–	o	o	o	–	–	–	◊	0/4
	Metal Molds for Fresco Cheese	o	o	–	–	o	o	o	–	–	◊	0/4
	Otate Basket (Chiquigüite)*	o	o	–	–	o	o	–	o	–	◊	0/4
	Hands	–	–	o	–	o	o	o	o	o	<i>L. innocua</i>	1/4
	Processing surfaces	–	–	–	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	0/4
	Refrigerator	–	–	<i>L. innocua</i> , <i>L. welshimeri</i>	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	◊
Floor and brushes	Processing area floors	–	–	<i>L. innocua</i>	–	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
	Brush for cleaning surfaces and equipment	o	–	–	–	o	o	–	◊	◊	◊	0/4
	Broom	–	–	–	<i>L. innocua</i>	◊	◊	◊	◊	◊	◊	1/4
Total Positive Samples		0	0	2	4	0	0	0	0	0	1	7/99

†_ Negative. ‡ ◊ Point sampled 4 times, and then no sampled again. * o No sampled. || Little cylindrical molds made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L. # Conic basket with diameter aproximate of 60 cm, made with steams of *Chusquea acuminata* Döll or *Arundo donax* L.

ICMF para el muestreo de *Listeria* en productos lácteos (Grace 1992), que establece un volumen de 750 g, el cual fue redondeado a 800 g para tomar porciones similares de todos los quesos (figura 1). Se analizaron 25 g de cada muestra compuesta.

Equipos y superficies en contacto con alimento: Se usaron gasas estériles para frotar los equipos (1–5 gasas por equipo) y superficies (1000 cm², una gasa por cada 200 cm², 5 gasas por superficie). Cuando las superficies o el equipo se encontraban secos, se humedeció la gasa con agua peptonada (0.1 % peptona de caseína). Se muestrearon las telas para filtrar leche y moldear queso Adobera cortando porciones representativas de acuerdo a su tamaño (13–329 cm²). En general, las telas se humedecían antes de su uso, por ello, se colectaron, dos telas secas y dos telas húmedas en cada quesería, excepto en la quesería D donde las telas para filtrar leche no fueron humedecidas. Para muestrear las manos a cada trabajador se le dio una gasa quién la frotó como si fuera una toalla para secarse las manos. Las muestras del equipo y otras superficies en contacto con alimentos se tomaron por la mañana, antes de iniciar la

Equipment and food-contact surfaces: Sterile cotton gauzes were firmly rubbed over equipment (1–5 per piece) and surfaces (1000 cm², one gauze for each 200 cm², 5 gauzes per surface). When surfaces or equipment were dry, the gauze was moistened with water peptone (0.1% casein peptone). Cloths for filtering milk and molding *Adobera* were sampled by cutting representative portions according to size (13–329 cm²). Cloths are usually moistened before use, which is why two dry cloths and two moistened cloths were sampled at each plant, except D, where the cloths for filtering milk were never moistened. Workers' hands were sampled using cotton gauze as a towel to dry them (1 gauze per worker). Equipment and other food-contact surfaces were sampled in the morning before cheese production began, and workers' hands were also sampled during production (figures 2 and 3).



Figura 2. Equipo y superficies en queserías artesanales. **A** chiquigüites; **B** molino; **C** tela para filtrar leche, presenta los cortes hechos para el análisis; **D** tela para moldear queso Adobera, presenta los cortes hechos para el análisis; **E** saco de polietileno para drenar (escurrir) la cuajada.

Figure 2. Equipment in artisanal cheese plants. **A** otate baskets (chiquigüites); **B** mill; **C** cloth for filter milk, showing cuts done for analysis; **D** cloth for molding Adobera cheese, showing cuts done for analysis; **E** polyethylene sack to drain curd.

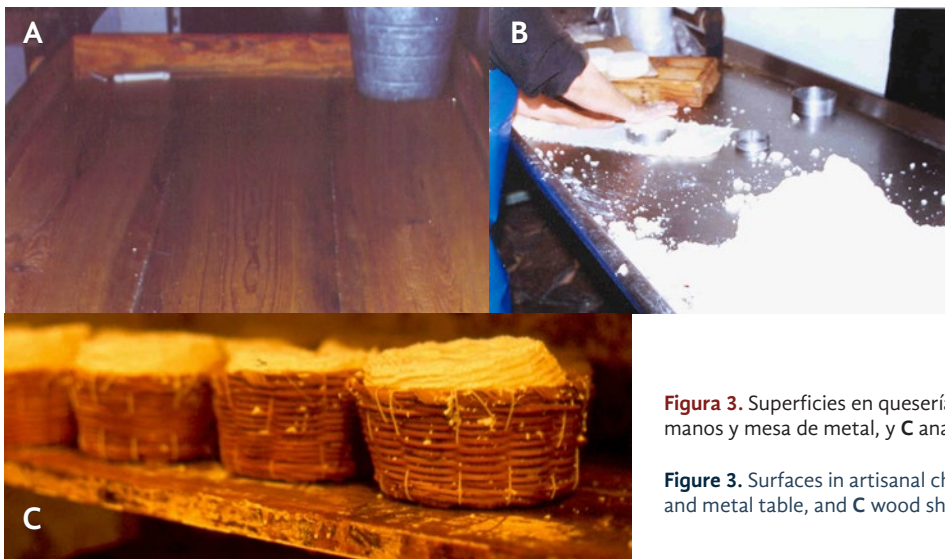


Figura 3. Superficies en queserías artesanales. **A** mesa de madera, **B** manos y mesa de metal, y **C** anaqueles de madera en refrigeradores.

Figure 3. Surfaces in artisanal cheese plants. **A** wood table, **B** hands and metal table, and **C** wood shelves in cooling chamber.

elaboración del queso, en tanto que las manos de los trabajadores se muestrearon durante la producción (figuras 2 y 3).

Pisos y equipo de limpieza: Las muestras del piso las conformaron cinco gasas (una por cada 200 cm²), que se usaron para muestrear 1000 cm², 500 cm² de área próximas a drenajes dentro de la quesería y 500 cm² de los pisos de las área de procesamiento y refrigeración. Para cada escoba se utilizó una gasa para frotar las fibras de plástico con que se barre. También se usó una gasa para frotar las fibras de los cepillos que se utilizan para limpiar superficies y equipos. Los cepillos de las queserías A, B y D fueron de las raíces de un pasto llamado “Zacatón” (*Muhlenbergia macroura* (Kunth) Hitch.), que se conocen como “escobetas”. Los cepillos de la quesería C fueron de plástico (figura 4).

Floors and cleaning equipment: Composite samples from floors were taken using 5 sterile cotton gauzes (1 gauze for each 200 cm²), which were used to sample 1000 cm² of floor space; 500 cm² from areas near drains inside the plants, and another 500 cm² from floors in the processing and refrigeration areas.

For each broom, a gauze was used to rub the plastic bristles. For two brushes, one gauze was used to rub the cleaning side. The brushes at Plants A, B, and D were made of vegetable fiber obtained from a grass known as *zacatón* (*Muhlenbergia macroura* (Kunth) Hitch.), but the brushes at Plant C were made of a plastic material (figure 4).



Figura 4. Piso y enseres de limpieza. **A** piso y escoba, y **B** escobetas hechas con raíces de raíces de *Muhlenbergia macroura* (Kunth) Hitch.

Figure 4. Floor and cleaning equipment. **A** floor and broom, and **B** brush made with roots of *Muhlenbergia macroura* (Kunth) Hitch.



Detección de inhibidores: A partir de la muestra con 250 ml de leche, se realizó la prueba BSDA (*Bacillus stearothermophilus* Disk Assay) para la detección de inhibidores microbianos en leche (Maturin 1995).

Aislamiento e identificación de *Listeria*: Las muestras fueron inoculadas en 225 ml de Caldo Enriquecimiento *Listeria* (CEL) (Donnelly 1999). Después de 24 a 48 h de incubación a 30 °C, se inocularon 10 µl en los medios de cultivo selectivos Agar cloruro de litio moxalactam (LPM, por sus siglas en inglés) y medio de Oxford modificado (MOX). El LPM y el MOX fueron preparados conforme a lo descrito por Lee McClain (Donnelly *op. cit.*), excepto que la concentración de cloruro de litio del MOX (Donnelly *op. cit.*) fue reducida de 15 a 10 g/l por observarse, en estudios anteriores, un efecto inhibitorio para algunos aislamientos de *Listeria* a la concentración 15 g/l (Luis Juan Morales, com. pers.). LPM Y MOX se incubaron por 48 h a 30 °C y 37 °C, respectivamente (figura 5).

Detection of inhibitory substances: *Bacillus stearothermophilus* Disk Assays (Maturin 1995) were performed to detect inhibitory substances in milk.

Isolation of *Listeria* and biochemical identification: Samples were inoculated in 225 ml of *Listeria* enrichment broth (Donnelly 1999). At the sampling sites where gauzes were used, up to 6 were employed. The gauzes used at each sampling site were placed in the same jar with 225 ml of enrichment broth. After 24 and 48 h of incubation at 30 °C, 10 µl from each enrichment broth were plated onto two selective media: lithium chloride-phenylethanol-moxalactam agar (LPM), and modified Oxford agar (MOX). LPM was prepared as described by Lee and McClain (Donnelly *op. cit.*). MOX was prepared as described by McClain and Lee with the exception of lithium chloride (Donnelly *op. cit.*). Because the 15 g/l concentration of lithium chloride was inhibitory for some *Listeria* isolates (Luis-Juan Morales, pers. comm.), it was decreased to 10 g/l. LPM and MOX were incubated for 48 h at 30 °C and 37 °C, respectively (figure 5).

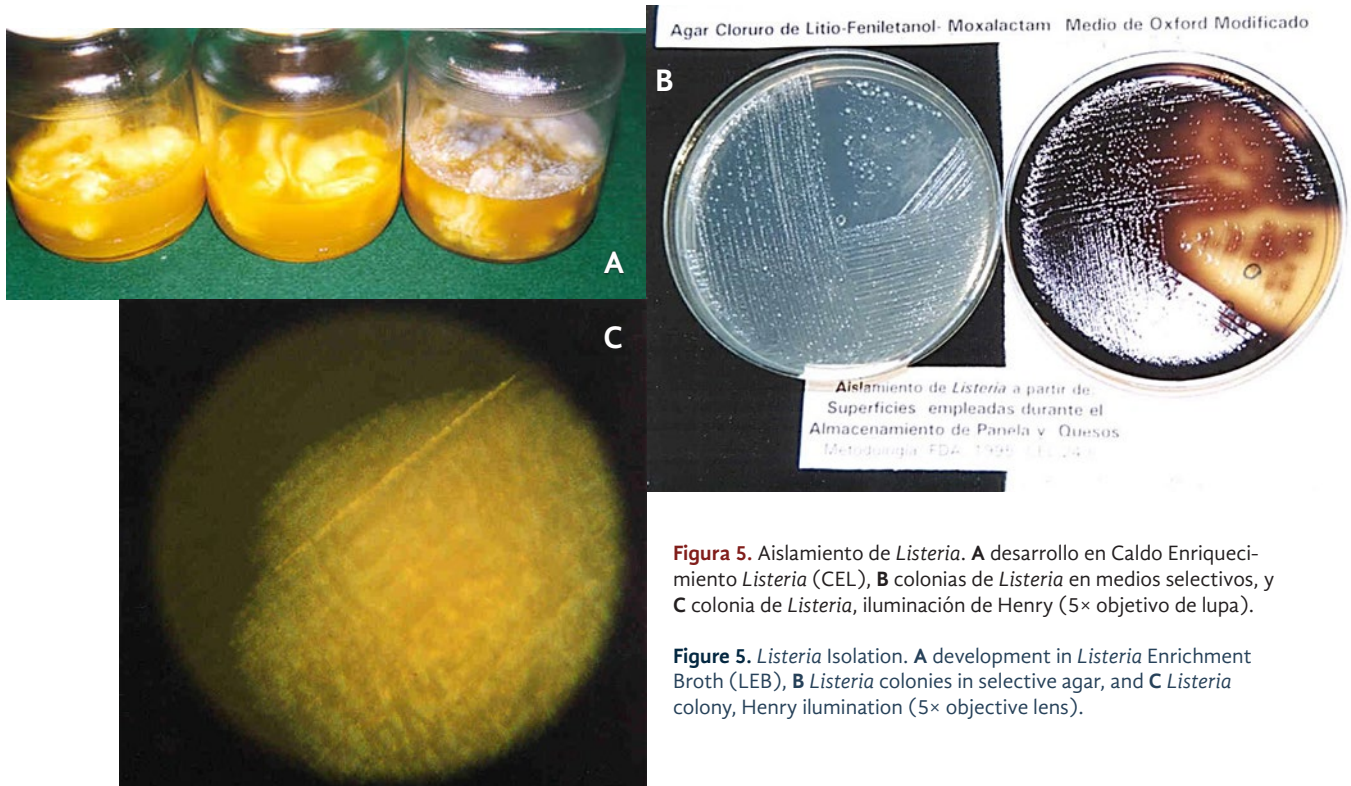


Figura 5. Aislamiento de *Listeria*. **A** desarrollo en Caldo Enriquecimiento *Listeria* (CEL), **B** colonias de *Listeria* en medios selectivos, y **C** colonia de *Listeria*, iluminación de Henry (5× objetivo de lupa).

Figure 5. *Listeria* Isolation. **A** development in *Listeria* Enrichment Broth (LEB), **B** *Listeria* colonies in selective agar, and **C** *Listeria* colony, Henry illumination (5× objective lens).

Las cajas de Petri que contenían Agar cloruro de litio moxalactam (LPM), se iluminaron conforme a la técnica de Henry (Hitchins 1995), que consiste en luz transmitida de manera oblicua para iluminar la caja en un ángulo de 45°, de esta forma, las colonias de *Listeria* presentan una tonalidad azul o azul-gris. Mediante este procedimiento se eligieron de 1 a 6 colonias por caja. Del Agar de Oxford Modificado (MOX) se seleccionaron 1–6 colonias negras. Todas las colonias fueron sembradas en Agar Soya Tripticasa con 0.6 % de extracto de levadura para verificar que fueran cultivos puros. Las especies de *Listeria* se identificaron de acuerdo con el esquema descrito por Hitchins (1995) mediante las pruebas de catalasa, Gram, movilidad, hemólisis, CAMP, rojo de metilo, Voges Proskauer, esculin hidrólisis y glucosa, maltosa, manitol, ramnosa y xilosa (figuras 5 y 6).

Using obliquely transmitted light sufficient to illuminate the plate well at a 45° angle (Henry illumination) (Hitchins 1995), 1–6 colonies colored blue-gray to blue were selected from each LPM plate. Also, 1–6 black colonies from MOX were chosen. All selected colonies were streaked for purification on Tryptic Soy Agar with 0.6 % yeast extract. *Listeria* species were identified following the scheme described by Hitchins (1995), using the following tests: catalase, Gram, motility, hemolysis, CAMP, methyl red, Voges Proskauer, esculin hydrolysis and glucose, maltose, mannitol, rhamnase, and xylose fermentation (figures 5 and 6).

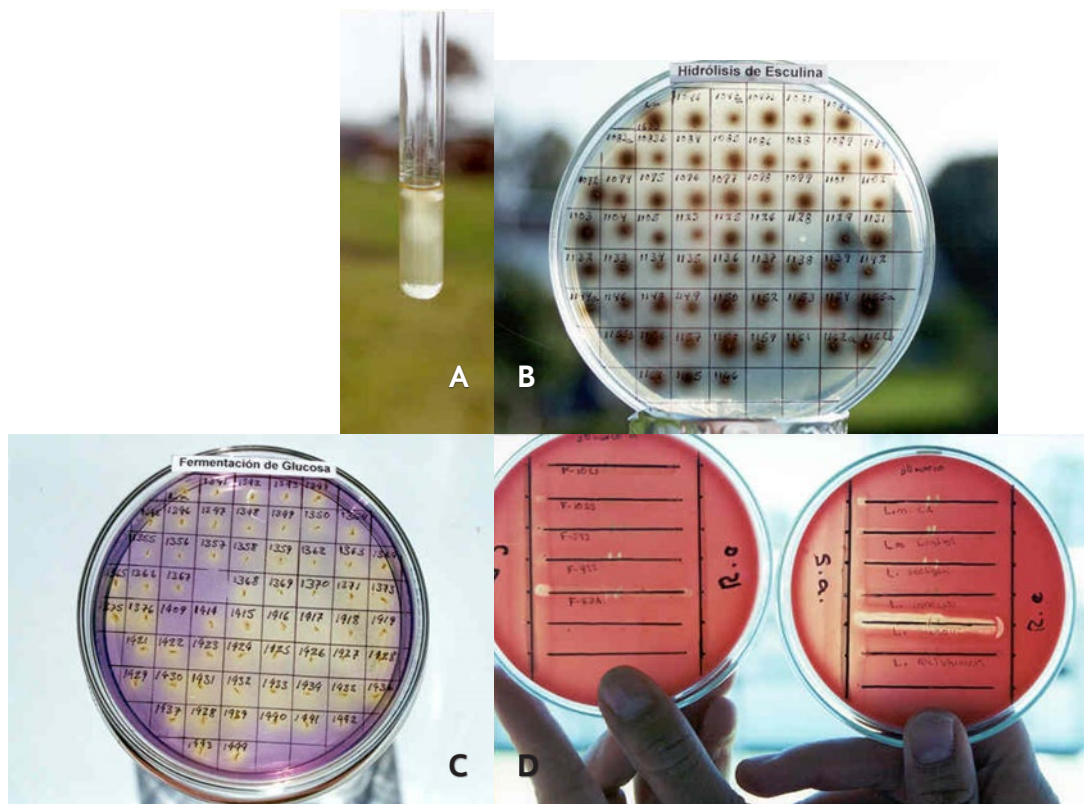


Figura 6. Algunas de las pruebas empleadas para la identificación de *Listeria*. **A** movilidad en forma de sombrilla; **B** hidrólisis de esculina, colonias negras; **C** fermentación de carbohidratos, colonias amarillas; y **D** pruebas de hemólisis (puntos claros al centro de líneas negras) y CAMP (puntas de flecha en líneas laterales), a la izquierda aislamientos de queserías y a la derecha cepas de *Listeria* empleadas como control.

Figure 6. Some of the tests used to *Listeria* identification. **A** motility test giving a typical umbrella-like growth pattern; **B** hydrolysis of esculin, black colonies; **C** carbohydrate fermentation, yellow colonies; **D** Hemolysis (central clear points in black lines) and CAMP test (arrowheads near to sidelines), on the left, isolates from artisanal cheese plants, on the right, *Listeria* strains used as control.

Serotipificación y huella genética de *Listeria monocytogenes*: De cada muestra positiva a *L. monocytogenes*, se eligió un aislamiento para serotipificación por el método de Seeliger & Höhne (1979) correspondiendo a 51 aislamientos de la quesería A y 20 de la quesería C. Se hizo caracterización de DNA a 19 aislamientos de los 2 serotipos más frecuentes: trece *L. monocytogenes* 1/2b de la quesería A obtenidos en los meses 1, 7, 20 y 21, así como seis *L. monocytogenes* 4b de la quesería C, obtenidos en los meses 1, 2, 4, 8 y 17. Para esta subtipificación de *L. monocytogenes* mediante macrorrestricción y electroforesis de campos pulsátiles (PFGE por sus siglas en inglés: Pulsed Field Gel Electrophoresis) se empleó el método descrito por Graves & Swaminathan en 2001. Los fragmentos de DNA fueron obtenidos con las endonucleasas de restricción *Apa*I y *Asc*I. El análisis para el patrón de bandas se realizó con el sistema de documentación Kodak® 1D 3.5.4. El tamaño de los fragmentos de restricción del DNA fue comparado con la cepa de referencia *L. monocytogenes* CLIP 77873. Los diferentes patrones fueron definidos por cambios en al menos una banda, esto es: ausencia de banda, banda extra o migración a una posición diferente (Yde & Gennicot 2004) (figura 7).

Las similitudes entre los patrones de restricción se establecieron con el programa NTSYS

***Listeria monocytogenes* serotyping and genetic fingerprinting:** From each positive sample for *Listeria monocytogenes* one isolate was serotyped according to the Seeliger & Höhne method (1979). In an effort to limit bias due to the type of isolation media or incubation time, isolates were selected from both LPM and MOX media. Nineteen isolates of the two most frequent serotypes isolated during the study were selected for DNA characterization; 13 *L. monocytogenes* isolates were selected from Plant A obtained in months 1, 7, 20, 21, while from Plant C, 6 *L. monocytogenes* isolates were obtained in months 1, 2, 4, 8, and 17. The Graves and Swaminathan protocol for subtyping *L. monocytogenes* by macro-restriction and PFGE was used (Graves and Swaminathan 2001). DNA restriction fragments were obtained using the *Apa*I and *Asc*I restriction endonucleases. Analysis of banding patterns was performed with the Kodak® 1D 3.5.4 documentation system. DNA restriction fragments were sized against the CLIP 77873 *L. monocytogenes* reference strain. Different profiles were defined by changes in at least one band; *i.e.*, a missing band, an extra band, or migration to a different position (Yde & Gennicot 2004) (figure 7).

Similarities between macro-restriction patterns were established by the NTSYS program

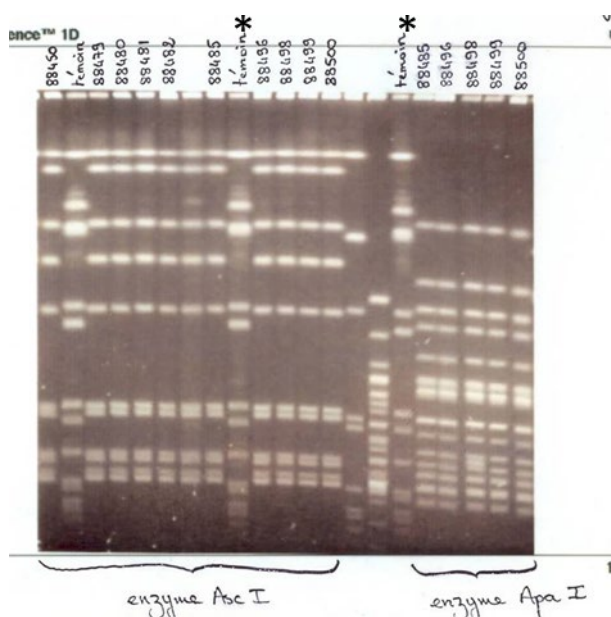


Figura 7. Patrones de DNA de aislamientos de *Listeria monocytogenes* obtenidos con las enzimas *Asc*I y *Apa*I por medio de electroforesis de campos pulsátiles. * Cepa de referencia *L. monocytogenes* CLIP 77873.

Figure 7. Some DNA patterns of *Listeria monocytogenes* isolates obtained with enzyme *Asc*I and *Apa*I by electrophoresis of pulsed fields. * *L. monocytogenes* reference strain CLIP 77873.

(Rohlf 2009) usando el método de agrupamiento UPGMA (siglas en inglés de unweighted pair-group method using arithmetic averages, método de agrupamiento de pares no ponderado utilizando medias aritméticas) y basado en el índice de Dice (Priest & Austin 1993).

Análisis estadístico: Las pruebas exacta de Fisher o Chi cuadrada fueron usadas para el análisis estadístico en el programa Epi Info™ (Dean *et al.* 2000). El valor de significancia fue al nivel de 5 % de dos colas.

Resultados

Las muestras de leche fueron negativas a *Listeria* (cuadro 2) y residuos de antimicrobianos; solo una muestra de leche fue positiva a inhibidores no específicos (inhibidores termolábiles propios de la leche). Todas las muestras de cuajo fueron negativas a *Listeria* (cuadro 2).

En al menos una ocasión, 23 de los 25 puntos de muestreo fueron positivos. Los sitios con mayores frecuencias de *Listeria* fueron: escobas, refrigeradores, canastos, recipientes para cuajar y superficies para procesamiento (cuadros 3–6).

Si bien, las frecuencias en cada quesería fueron diferentes, las muestras de recipientes para cuajar, refrigeradores, escobas y pisos fueron positivas al menos una vez en las cuatro queserías (cuadros 3–6).

En la quesería A, 52 (55 %) de las 95 muestras fueron positivas, aislándose *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* y *L. welshimeri*. Se aisló *L. monocytogenes* en 51 muestras (98 % de las muestras positivas) entre las que se incluyen las ocho correspondientes a quesos y las 4 de escobas. *L. welshimeri* catalasa positiva se aisló del molino y en las telas para colar la leche, se encontró *L. welshimeri* catalasa negativa. Los serovares de *L. monocytogenes* identificados fueron: 4d (1 muestra), 1/2 inmóvil (dos muestras), 1/2a (8 muestras) y 1/2b (40 muestras) (cuadro 3).

En la subtipificación mediante PFGE, de un aislamiento de *L. monocytogenes* 1/2 inmóvil y doce del serovar 1/2b, con la enzima AscI se

(Rohlf 2009) using the pair-group method with arithmetical-average (UPGMA) clustering based on the Dice correlation coefficient (Priest & Austin 1993).

Statistical analysis: Chi square or Fisher's exact tests were used for statistical analysis. The significance value for all tests was set at the 5 % 2-sided level. Statistical analyses were performed using Epi Info™ software (Dean *et al.* 2000).

Results

Listeria was not isolated from milk or rennet (table 2). Milk samples were negative for antimicrobial residues and only one was positive for non-specific milk inhibitors (thermolabile milk inhibitors). *Listeria* was isolated at least once from 23 of the 25 sampling sites. Those with the highest frequencies were brooms, refrigerators, baskets, curdling vats, and processing surfaces (tables 3–6). Samples from vats, refrigerators, brooms and floors were positive at least once in all 4 artisanal cheese plants (tables 3–6), though *Listeria* frequencies differed at each plant.

At Plant A, 52 of 95 (55 %) samples were positive for *Listeria* (table 2), and 21 of 24 sampling sites tested positive at least once. Also, eight (53 %) of 15 samples of cheese were positive for *Listeria* (table 3). *L. monocytogenes*, *L. innocua* and *L. welshimeri* were identified. *L. monocytogenes* was isolated from 51 samples (98 % of positive *Listeria* samples) made up entirely of samples from brooms, never floors. *L. welshimeri* was isolated from the mill and milk-filtering cloths; the former was catalase-positive but the latter was negative. *L. monocytogenes* serovars 4d (1 sample), 1/2 non-motile (two samples), 1/2a (8 samples, 15 %), and 1/2b (40 samples, 77 %) were identified (table 3). PFGE sub-typing of one isolate of *L. monocytogenes* 1/2 non-motile and 12 isolates of *L. monocytogenes* serovar 1/2b with enzyme AscI generated a profile with 11 major fragments ranging in size from 58.8–690.5 kb, while the enzyme ApaI generated 3 profiles with 14–15 fragments ranging in size from 42.1–419.5 kb. Upon combining the profiles of both enzymes, 3 closely-related lineages emerged (figure 8). The first was observed in

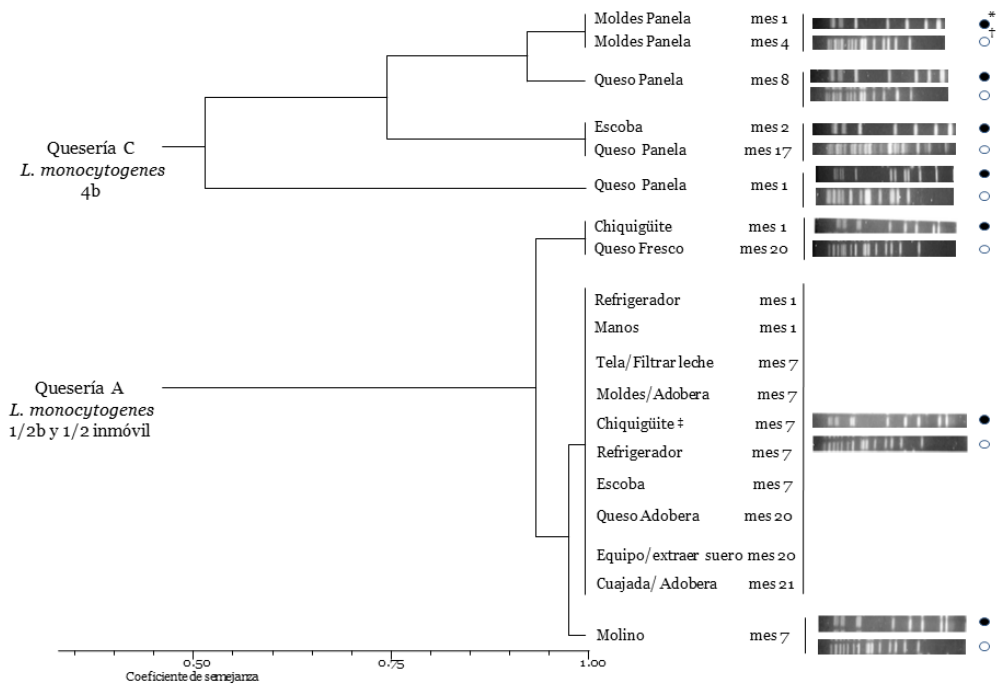
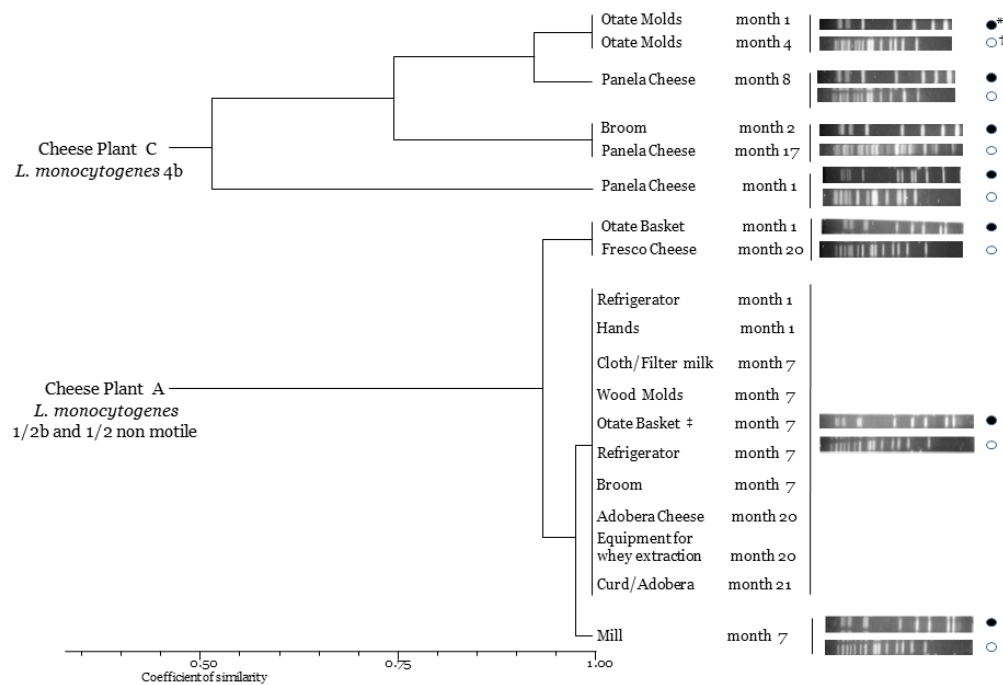


Figura 8. Dendrograma y patrones de macrorestricción de aislamientos de *Listeria monocytogenes*, empleando las enzimas *● *Ascl* y †○ *Apal*. ‡ *L. monocytogenes* 1/2 inmóvil. Análisis de semejanza basado en el coeficiente de correlación de Dice y agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean).

Figure 8. Dendrogram and macrorestriction patterns (UPGMA clustering based on Dice correlation coefficient) of *Listeria monocytogenes*, from two artisanal cheese plants. *● *Ascl* and †○ *Apal* PFGE profiles. ‡ *L. monocytogenes* 1/2 non motile.



observó un patrón compuesto de 11 fragmentos cuyo tamaño fue de 58.8 a 690.5 kilo bases (kb), en tanto que con la enzima *ApaI* se generaron 3 patrones con 14–15 fragmentos con tamaños de 42.1 a 419.5 kb. Al combinar los patrones de ambas enzimas, se identificaron 3 linajes estrechamente relacionados. El primer linaje fue observado en los meses 1 y 20 en moldes y queso fresco, respectivamente. El segundo linaje incluyó al serovar 1/2 inmóvil y fue identificado en los meses 1, 7, 20 y 21 a partir de: superficies en contacto con los quesos, equipo, cuajada y queso adobera. El tercer linaje solo fue encontrado en el molino en el mes 7 (figura 8).

En la quesería B, de las 98 muestras, el 31 % fueron positivas a *Listeria innocua*, que fue la única especie presente durante 18 meses y fue aislada del equipo, superficies en contacto con los quesos, piso, cepillos y escobas, pero no de ingredientes, cuajadas o quesos (cuadro 4).

En la quesería C, el 26 % de las 100 muestras fueron positivas. Las especies identificadas correspondieron a *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* y *L. ivanovii* (cuadro 5). Durante 15 meses, se aisló *L. welshimeri* de diferentes sitios, fue más frecuente su aislamiento en esta quesería (27 % de los aislamientos) que en las otras (OR 8.71, I.C. 2.32–35.40. $P = 0.0002$). De los 22 aislamientos de *L. monocytogenes*, 20 (91 %) fueron serovar 4b (cuadro 5). Los seis aislamientos de *L. monocytogenes* 4b tipificados por PFGE mostraron 4 patrones con la enzima *ApaI* y 2 con la enzima *AscI*. El número de bandas generadas por *AscI* fue de 10 a 11, con un peso molecular de 50.32 a 690.5 kb. Con la enzima *ApaI* se observaron de 15 a 20 bandas con pesos moleculares de 26.71 a 669.7 kb. La combinación de los patrones observados con ambas enzimas generó 4 pulsotipos, uno solo fue encontrado en los moldes para queso panela y los otros 3 se aislaron de queso panela, y la escoba. El pulsotipo de la escoba coincidió con el encontrado en queso panela 15 meses después (figura 8).

En la quesería D, siete de 99 muestras (7 %) fueron positivas para *Listeria*. Los aislamientos de *Listeria* fueron obtenidos en 3 de las 11 visitas, a partir de 6 de 25 puntos de muestreo. *L. in-*

months 1 and 20 in molds and *Fresco* cheese, respectively; whereas the second lineage grouped *L. monocytogenes* 1/2 non-motile and 1/2b, which were present in months 1, 7, 20 and 21 from surfaces in contact with cheese, equipment, curd, and *Adobera*. The third lineage was found only in the mill in month 7 (figure 8).

In Plant B, 98 samples were collected, of which 31 % were positive for *Listeria innocua*; the only species isolated from 13 of 25 sampling sites during an 18-month period (table 4). These bacteria were isolated from equipment, food-contact surfaces, floors, brushes and brooms, but not from ingredients, curds or cheeses (tables 2, 4).

At Plant C, 26 % of 100 samples corresponding to 13 of 25 sampling sites (table 1) were positive for *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* and *L. ivanovii* (table 5). During a 15-month period, *L. welshimeri* (27 % of isolates) was isolated from different sampling sites at this plant more frequently than at others (OR 8.71, I.C. 2.32–35.40. $P = 0.0002$). Of the 22 *L. monocytogenes* isolates, 20 (91 %) were serovar 4b (table 5). Six isolates of *L. monocytogenes* 4b displayed 4 pulsotypes with the enzyme *ApaI*, and 2 pulsotypes with the enzyme *AscI*. The number of bands produced with *AscI* was 10 or 11, and with *ApaI* from 15-to-24, with molecular sizes that ranged from 50.32–690.5 kb and 26.71–669.7 in length, respectively. The combination of two enzymes generated 4 pulsotypes. Three were found in *Panela*, and one was the same as the isolate from the broom found 15 months earlier. The other pulsotype was found in the *otate* molds (figure 8).

In Plant D, 7 of 99 samples (7 %) were positive for *Listeria*. *Listeria* isolates were recovered on 3 of 11 visits, but from only 6 of 25 sampling sites (table 4). It is important to note that *L. monocytogenes* was not identified. *L. innocua* was isolated in all 7 samples, and *L. welshimeri* was isolated from one refrigerator sample (table 5). All molds, baskets and plastic sack samples were negative for *Listeria* (table 6).

While working dairies in morning and evening shifts, only the practices during the morn-

nocua fue aislada en las siete muestras positivas y *L. welshimeri* solo fue aislada del refrigerador. Todas las muestras de moldes, canastos y sacos de plástico fueron negativas a *Listeria* (cuadro 6).

Si bien las queserías trabajaron en turnos matutino y vespertino, solo se registraron las prácticas realizadas durante el turno matutino. Comparada con las queserías A, B y C, en la D se observó un mayor número de prácticas de limpieza, destacando la aplicación de tratamientos térmicos superiores a 70 °C a una parte del equipo y el vaciado de agua o suero caliente al drenaje (cuadro 7 y figura 9).

ing shift were recorded. Compared to dairies A, B and C to D a larger number of cleaning practices observed, emphasizing the application of higher heat treatments at 70 °C to a piece of equipment and emptying hot water or whey drainage (table 7 and figure 9).

Cuadro 7. Prácticas de limpieza observadas durante el turno matutino en queserías artesanales.

Práctica	Quesería			
	A	B	C	D
Inmersión de moldes para queso Panela en agua caliente > 70 °C/27 minutos cada tercer día.	-	-	-	+
Aplicación de suero caliente (90 °C) a chiquigüites y mantas antes de depositar en ellos requesón.	-	-	-	+
Cepillado de cámara de refrigeración, empleando agua y jabón, cada tercer día.	-	-	-	+
Lavado diario de telas con agua y jabón.	-	+	-	+
Inmersión de costales y moldes en agua o suero caliente.	-	-	-	+
Lavado de costales con agua y jabón.	-	+	-	+
Enjuague con agua de las superficies para elaboración del queso al inicio y fin de la jornada matutina.	+	+	+	-
Cepillado y enjuague con agua (ocasionalmente también con jabón) de superficies para elaboración de queso al inicio y fin de la jornada matutina.	-	-	-	+
Vaciado al drenaje, de agua o suero caliente al menos una vez al día.	-	-	-	+

- Ausente , + presente.

Table 7. Cleaning procedures observed on morning session in artisanal cheese plants.

Procedure	Cheese Plant			
	A	B	C	D
Immersion olate molds in hot water > 70 °C/27 minutes every 3th day.	-	-	-	+
Apply hot whey (90 °C) to chiquigüites and cloths before put Requeson on them.	-	-	-	+
Brush cooling chamber using water and soap every 3th day.	-	-	-	+
Daily cloth washing with water and soap.	-	+	-	+
Immersion sacks and molds in water or whey hot.	-	-	-	+
Wash sacks with soapy water.	-	+	-	+
Rinse with water surfaces for cheese making at the beginning and end of the morning session.	+	+	+	-
Brushing and rinsing with water (sometimes also with soap) surfaces for cheese making at the beginning and end of the morning session.	-	-	-	+
Emptying the drainage, hot water or whey at least one time per day.	-	-	-	+

- Absent, + present.

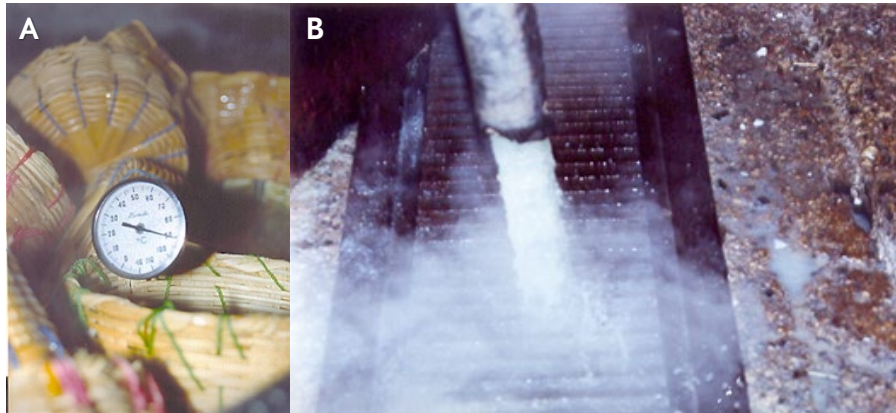


Figura 9. Tratamientos térmicos en queserías artesanales. **A** inmersión de moldes en agua caliente > 70 °C, y **B** vaciado al drenaje de agua caliente.

Figure 9. Thermic treatments in artisanal cheese plants. **A** immersion of molds in hot water > 70 °C, and **B** emptying the drainage, hot water.

Discusión

En la frecuencia de *Listeria* reportada en plantas de productos lácteos puede influir: el tipo de muestras colectadas, periodo de duración del muestreo, número de queserías muestreadas y el tipo o escala de producción como son el industrial o anexa a los establos (Cox *et al.* 1989, Pritchard *et al.* 1994). La frecuencia de *Listeria* en queserías, quesos y medio ambiente de áreas de procesamiento oscila entre el 6 % al 18 % (Jacquet *et al.* 1993, Kabuki *et al.* 2004, Pritchard *op. cit.*), los porcentajes de 3 de las 4 queserías fueron mayores a los mencionados, esto puede deberse a ciertas características de la producción artesanal, tales como que el personal y el equipo son empleados para múltiples actividades, permitiendo múltiples contaminaciones cruzadas durante el proceso de elaboración del queso.

A partir de varios estudios, Ryser (1999) reporta que los rangos de incidencia de *Listeria* en leche cruda son los siguientes: *L. innocua* 3.4–10 %, *L. monocytogenes* 3–3.8 %, *L. welshimeri* 0.7–0.9 % y otras especies 0.3–1.2 %. (Ryser 1999). Aún cuando se emplearon dos procedimientos (FDA y torunda de Moore), *Listeria* no fue aislada de las muestras de leche. Quizás la ausencia de la bacteria en la leche fue real. También es posible que el bajo número de muestras, solo 16, o los bajos niveles de *Listeria* en las muestras, influyeron en estos resultados. Sin embargo, encontramos altas frecuencias en otros puntos de muestreo analizando el mismo número de muestras (cuadros 2–6), lo que sugiere que la leche

Discussion

Listeria frequencies reported in dairy plants may be influenced by: 1) type of samples collected; 2) sampling period duration; 3) number of plants sampled; and, 4) production scale (Cox *et al.* 1989; Pritchard *et al.* 1994). *Listeria* frequencies in cheese plants, cheeses and food processing environments range from 6–18% (Jacquet *et al.* 1993; Kabuki *et al.* 2004; Pritchard *op. cit.*). The frequency of *Listeria* at 3 of the 4 plants studied was higher than these figures. This could be related to certain characteristics of artisanal production; for example, the fact that staff and equipment are used for multiple activities and so may generate multiple opportunities for cross-contamination during production.

Ryser (1999) reported ranges of *Listeria* incidence in raw milk from several studies as follows: *L. innocua*, 3–10 %; *L. monocytogenes*, 3–4 %; *L. welshimeri*, 0.7–0.9 %; and other species, 0.3–1 %. Although we used two sampling procedures (FDA and Moore's swab), *Listeria* was not isolated from milk samples, so it is possible that the absence of contamination in raw milk was real. But it may also be that the low number of samples (only 16), or low levels of *Listeria* in samples could explain these results. However, we found high frequencies at other sampling sites after analyzing the same number of samples (tables 2–6); suggesting that raw milk may not have been a frequent source of contamination at these artisanal cheese plants.

cruda no fue una fuente frecuente de contaminación en las queserías artesanales.

En las cuatro queserías, los lecheros tenían acceso a las áreas de procesamiento para descargar la leche en los recipientes para cuajar. Después de vaciar la leche, las cántaras eran enjuagadas usando agua y equipo empleado en la extracción del suero. Estas prácticas podrían introducir *Listeria* de la leche y los establos al medio ambiente del área de procesamiento. La quesería B recibió leche de un solo proveedor, las queserías A y C de dos proveedores y la quesería D de 10, sin embargo, la quesería D tuvo las frecuencias más bajas de muestras positivas y un mayor número de prácticas de limpieza (cuadros 2, 6 y 7) esto sugiere que el medio ambiente y las prácticas de limpieza influyen en la frecuencia y especies de *Listeria* que podrían aislarse o implantarse en las queserías artesanales. Esta situación es similar a la reportada en una planta elaboradora de queso Minas Frescal, en la cual no se aisló *Listeria* de la leche cruda y el área de ordeño, pero si se aisló de varios puntos de la planta (Renaldi *et al.* 2008).

Listeria no se aisló del cuajo, esto concuerda con que el producto contiene 1.9 % de propionato de sodio y 0.1 % de benzoato de sodio, compuestos que pueden inhibir o inactivar a *L. monocytogenes* (Lou and Yousef 1999). De acuerdo con estudios previos, la presencia de *Listeria* en equipo de queserías varía del 1.7 % al 30.7 % (Cox *et al.* 1989, de Cesare *et al.* 2007, Kabuki *et al.* 2004).

En esta investigación, el rango de frecuencias fue de 2 % en la quesería D a 58 % en la quesería A (cuadro 2), esto muestra que el nivel de contaminación del equipo estuvo relacionado con cada quesería y destaca el papel que tiene el equipo en la contaminación de los quesos con *Listeria* durante su elaboración artesanal.

Los hallazgos de baja frecuencia de *Listeria* y no aislamiento de *L. monocytogenes* observados en la quesería D, pueden explicarse considerando que esta quesería usaban agua hirviendo y suero calentado a 90 °C para limpiar pisos, equipo, moldes y chiquigüites, procedimiento que puede eliminar a la bacteria puesto que tempera-

At all four plants, the milkmen had regular access to processing areas, where they emptied milk into curdling vats. After emptying, the milk cans were rinsed with water in equipment used for whey extraction. These practices could introduce *Listeria* from milk and barns into the food-processing environment. Plant B received milk from only one supplier, Plants A and C from two, and Plant D from ten. However, Plant D had the lowest numbers of both *Listeria* isolates and positive and a large number of cleansing practices (tables 2, 6 and 7), which suggests that plant environment and cleaning practices influenced the kind of *Listeria* that could be isolated and/or implanted in these artisanal plants. This situation is similar to that reported for the Minas Frescal cheese dairy plant, where *Listeria* was not found in raw milk or the milking area, though several sampling sites in the plant did test positive for *Listeria* (Renaldi *et al.* 2008).

Listeria was not isolated from rennet, which contains 1.9 % sodium propionate and 0.1 % sodium benzoate. This was to be expected because these salts can inhibit and/or inactivate *L. monocytogenes* (Lou & Yousef 1999). According to previous studies, the frequency of the presence of *Listeria* in cheese plant equipment varies from 1.7-to-30.7 % (Cox *et al.* 1989; de Cesare *et al.* 2007; Kabuki *et al.* 2004).

Prevalences ranging from 2 % (Plant D) to 58 % (Plant A) (table 2) show that the level of equipment contamination is relative to each plant. Also, this highlights the role of equipment in *Listeria* contamination of cheese during artisanal production.

The lowest prevalence of *Listeria* with no isolation of *L. monocytogenes* was observed in Plant D. These findings could be explained by the fact that this particular plant uses boiling water and whey heated to 90 °C to clean floors, equipment, molds and baskets. In fact, it has been shown that temperatures above 50 °C are lethal to *L. monocytogenes* (Lou & Yousef 1999).

High incidences of *Listeria* have been reported from drains and floors in food-processing facilities, suggesting that these areas may be reservoirs for *Listeria* (Gravani 1999). In our work,

turas mayores a 50 °C son letales para *L. monocytogenes* (Lou and Yousef 1999).

Existen reportes de una alta incidencia de *Listeria* en drenajes y pisos de áreas de procesamiento de alimentos, lo cual sugiere que estas áreas pueden ser reservorios de *Listeria* (Gravani 1999). En nuestro trabajo, *Listeria* se aisló del piso de todas las queserías y la escoba fue el punto con mayor frecuencia de *Listeria*. En la quesería C, el patrón de PFGE de la escoba, fue el mismo aislado del queso Panela 15 meses después (figura 8). Además hubo coincidencia de las especies de *Listeria* en la escoba y el refrigerador (cuadro 5). En la quesería D, en la misma fecha (agosto), *L. innocua* fue aislada de los recipientes para cuajar, la cuajada, el refrigerador y la escoba. Las queserías A y C usaban la misma escoba para barrer el área de procesamiento y el piso del área de refrigeración. Con base a estos datos, consideramos que la escoba colecta y disemina *Listeria* presente en el piso, siendo un vehículo importante de contaminación cruzada en las queserías artesanales.

Gravani (1999), al observar que *Listeria innocua* fue más frecuente en pisos, agua estancada, residuos y equipo, sugiere que *L. innocua* es trasladada de los drenajes a los pisos y residuos y luego diseminada por los empleados al equipo en contacto con el producto. Esta situación pudo ocurrir en las queserías artesanales, donde hubo coladeras de drenaje abiertas y *L. innocua* fue aislada de la escoba y pisos.

Solo se muestreó el interior de los recipientes para cuajar, pero, al fin de cada día, cuando almacenaban los recipientes, la parte externa de un recipiente era introducida en el interior del siguiente. Esta práctica podría introducir *Listeria* del piso al interior de los recipientes. Otra situación observada fue, cuando los trabajadores transferían leche o cuajada de un recipiente a otro, tocaban el fondo externo del recipiente, maniobra que puede introducir *Listeria* del piso a la leche o cuajada y contaminar el interior de los recipientes.

El hallazgo de pulsotipos idénticos o estrechamente relacionados en quesos, refrigeradores, moldes y chiquiüites (figura 8), sugiere

Listeria was isolated from the floors in all four plants, while the brooms were the sampling sites that had the highest incidence of *Listeria*. The *Listeria* PFGE profile from Plant C found in brooms was the same as the one seen in *Panela* cheese (figure 8). And this *Listeria* species was also found on brooms and in refrigerators (table 5). On the same date in Plant D (August) *L. innocua* was isolated from curdling vats, curd, the refrigerator and brooms. Plants A and C used the same broom to sweep processing areas and the floor of the refrigeration room. This leads us to consider that brooms, which collect and disseminate *Listeria* present on the floor, are an important vehicle of cross-contamination in artisanal cheese plants.

Gravani (1999) observed that *L. innocua* was more frequent on floors and in stagnant water, residues and equipment, which suggests that *L. innocua* moved from drains to floors and residues, and was then disseminated by workers to processing equipment in contact with product. This situation could occur in the artisanal plants studied because *L. innocua* was isolated from brooms and floors where open drain grills were observed. When compared to Plants B, C and D, the high level of contamination at Plant A could be explained by the conjunction of deficiencies in cleaning procedures with the location of cheese-processing areas close to open drains.

We only sampled the interior of vats but learned that at the end of each day vats were stacked such that the outside of one is introduced inside another, a practice that could introduce *Listeria* from the floor into the vats. Another situation observed during processing involved operators transferring curd from vat-to-vat. After touching the outside bottom of the curdling vats, workers could introduce *Listeria* from the floor to milk and curd, thus contaminating the interior of the vats.

Molds and baskets for *Panela* are used in processing areas (to drain curd and extract whey) and refrigerators (drying/molding *Panela*, refrigerating *Requesón*). The same –or a closely-related– pulsotype was found in cheeses, refrigerators, molds and baskets (figure 8), suggesting cross-contamination between equipment, chee-

contaminación cruzada entre equipo, quesos y anaqueles de refrigeración aspecto que coincide con la utilización de moldes para queso Panela y chiquigüites tanto en áreas de proceso (drenaje de la cuajada, extracción de suero) o en refrigeración (secado-moldeado de queso Panela, y refrigeración del Requesón). Es posible que el chiquigüite y los moldes se contaminen cuando entran en contacto con pisos, superficies o cuajadas. El chiquigüite puede contaminar las cuajadas de los quesos Panela y Fresco cuando es usado para drenar la cuajada, a su vez, las cuajadas contaminan otros equipos y superficies del área de proceso. Los moldes y chiquigüites transportan *Listeria* cuando son introducidos al los refrigeradores.

Durante la producción de quesos madurados (Brie, Camembert, Brick, Limburger), el cuarto de maduración y los anaqueles son sitios donde *Listeria monocytogenes* puede crecer y contaminar el producto (Gravani 1999). La frecuencia de *Listeria* sp. en refrigeradores fue del 67 % y este punto de muestreo fue positivo de 2 a 4 veces en cada quesería (cuadros 3–6), lo que sugiere que la refrigeración podría representar una de las etapas con mayor riesgo para la contaminación de los quesos elaborados artesanalmente. Moreno Enriquez *et al.* (2007) también reporta contaminación en refrigeradores y superficies del área de proceso de un queso similar al Panela en una quesería de Sonora, México. El suero es una fuente de crioprotectores (carnitina y betaina) usados por *L. monocytogenes* para desarrollar a temperaturas de refrigeración (Angelidis *et al.* 2002, Annous *et al.* 1997, Ko *et al.* 1994). El suero liberado por los quesos Panela, Fresco y Adobera durante la refrigeración, genera una fuente continua de nutrientes y crioprotectores para *Listeria* que haya sido introducida a refrigeradores, esto explica cómo las superficies de las áreas de refrigeración se convierten en un reservorio de *Listeria*. Puede considerarse que el piso y los refrigeradores son reservorios que actúan en conjunción con las contaminaciones cruzadas explicando así la presencia y persistencia de *Listeria* en las queserías artesanales.

Existen variaciones en la frecuencia de *Listeria* en las manos de los trabajadores según el tipo de trabajo (Kerr *et al.* 1993), por ejemplo, *Liste-*

es and shelves. Baskets and molds are likely to be contaminated when in contact with floors, surfaces or curd. Baskets can contaminate the curd of *Panela* and *Fresco* cheese when used for draining, and then the curd can contaminate other equipment and processing surfaces. Molds and baskets can also transport *Listeria* into the refrigerators.

During production of surface-ripened cheeses (Brie, Camembert, Brick, Limburger), the ripening rooms and shelves are sites where *L. monocytogenes* can grow and contaminate products (Gravani 1999). The prevalence of *Listeria* sp. in refrigerators was 67 %, and this sampling site tested positive on 2–4 occasions in each plant (tables 3–6), indicating that refrigeration could represent one of the greatest hazards for contamination in artisanal cheese production. Moreno-Enriquez *et al.* (2007) reported contamination on processing surfaces, in coolers, and in a soft cheese similar to *Panela* in a plant in Sonora, Mexico. Whey is a source of cryoprotectants (carnitine and betaine) that are used by *L. monocytogenes* to grow at refrigerated temperatures (Angelidis *et al.* 2002; Annous *et al.* 1997; Ko *et al.* 1994). The whey that oozes through *Panela*, *Fresco* and *Adobera* cheeses during refrigeration produces a continual source of nutrients and cryoprotectants for any *Listeria* that may find its way into refrigerators, and this could explain how refrigerator surfaces become *Listeria* reservoirs. Floors and refrigerators are reservoirs that together with cross-contaminations explain the presence and persistence of *Listeria* in artisanal cheese plants.

Variations in the frequency of *Listeria* found on workers' hands according to the specific activities performed have been reported (Kerr *et al.* 1993). In two *Minas Frescal* cheese plants, *Listeria* was not isolated from gloves or hands (Silva *et al.* 2003), but in two poultry-processing plants frequency was clearly influenced by work area: from 0 % in the eviscerating room to 40 % in the cutting room (Chiarini *et al.* 2009). In the artisanal cheese plants studied, the molds for *Fresco*, *Adobera* and *Panela* were made manually, and the concordance between the *Listeria* species and pulsotypes found on workers' hands and at other sampling sites at the plant (tables

ria no fue aislada de guantes o manos en dos queserías que elaboraban queso Minas Frescal (Silva *et al.* 2003) pero en dos procesadoras de carne de pollo, las frecuencias variaron entre las diferentes áreas: 0 % en evisceración a 40 % en corte o despiece (Chiarini *et al.* 2009). En las queserías artesanales, la etapa de moldear los quesos se realizó de forma manual, la concordancia de especies de *Listeria* y pulsotipos aislados de las manos y otros puntos de muestreo en la misma quesería (cuadros 3, 5, 6 y figura 8), sugieren que la contaminación de las manos, refleja la contaminación de la quesería, así como la participación de los trabajadores en la diseminación de *Listeria* en la planta.

La presencia de ciertas especies de *Listeria* pudo ser influida por el tipo de sustratos presentes en las queserías y por la utilización de carbohidratos presentes en la leche o el suero. La fermentación de lactosa por *L. monocytogenes* es variable, del 11 al 89 % de las cepas son positivas a lactosa (Lou & Yousef 1999), en tanto que todas las cepas de *L. innocua* fermentan la lactosa (Seeliger & Jones 1986) lo que podría explicar su aislamiento en las cuatro queserías, donde siempre hubo presencia de leche y suero en pisos y superficies. *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, y *L. welshimeri* fermentan xilosa, la cual puede ser obtenida cuando el polímero xilano de la madera es desdoblado por las xilanasas de microorganismos del suelo, el cuál es un hábitat de *Listeria* (Cox *et al.* 1989). Suponemos que la presencia y persistencia de *L. welshimeri* en las queserías A, C y D (cuadros 3, 5 y 6) estuvo asociada a la presencia de madera vieja como soporte del molino en la quesería A y estantes en las áreas de refrigeración de las queserías C y D. Si bien, *L. ivanovii* ha sido aislada de quesos (Guerra-María & Bernardo 1999), se observó un bajo nivel de frecuencia (4 % de todas las muestras positivas en la quesería C; 0.87 % del total de muestras positivas), lo cuál contrasta con los hallazgos en una fábrica de queso Manchego donde *L. ivanovii* fue el aislamiento predominante mostrando persistencia por un período de 6 meses (Vázquez-Villanueva *et al.* 2010). El aislamiento de una sola especie de *Listeria* e incluso el predominio de una sola especie en sitios particulares de plantas industriales de productos lácteos ha sido reportado por Gravani (1999) y Slade (1992), el aislamiento de

3, 5, 6, figure 8) suggests that contamination of hands reflects contamination in the plant, and that workers participate in disseminating *Listeria*.

The presence of *Listeria* species could also be influenced by the kind of substrates present in the plants and the use of carbohydrates in milk or whey. Lactose fermentation by *L. monocytogenes* is variable, as 11–89 % of strains are positive for lactose (Lou & Yousef 1999). The fact that all *L. innocua* ferment lactose (Seeliger & Jones 1986) may explain the presence of these isolates in all four plants, since milk and whey were always present on floors and surfaces. *L. ivanovii*, *L. seeligeri* and *L. welshimeri* ferment xylose, which can be obtained when the wood xylan polymer is broken down by xylanases of microorganisms that are common in soil (Cox *et al.* 1989). We supposed that the presence and persistence of *L. welshimeri* in Plants A, C and D (tables 3, 5, 6) were associated with the presence of old wood in processing and refrigeration areas. In Plant A, a mill was mounted on a board, while Plants C and D have wooden shelves. Although *L. ivanovii* had been isolated previously from cheeses (Guerra-María & Bernardo 1999), our work shows a low-level occurrence of *L. ivanovii* in artisanal cheese plants (4 % of all positive samples from Plant C; 0.87 % of all positive samples) that contrasts with findings from a manchego cheese plant where *L. ivanovii* was the predominant isolate and persisted during a 6-month period (Vázquez-Villanueva *et al.* 2010). Isolation of single *Listeria* species in industrial dairy plants has been reported, and one single *Listeria* species may predominate at certain sites of plants (Gravani 1999; Slade 1992). Isolates of *L. innocua* in Plant B show that this phenomenon also occurs in artisanal production.

The phenomena of the presence and persistence of some species and serovars of *Listeria* associated with dairy plants have been related to persistent niches and the adaptation of *L. monocytogenes* to them (Ho *et al.* 2007; Keto-Timonen *et al.* 2007; Lomonaco *et al.* 2009). Replacing equipment and modifying installations and production lines are measures that can eliminate persistent strains (Keto-Timonen *et al.* 2007; Silva *et al.* 2003). The isolation of an

L. innocua como única especie en la quesería B, muestra que este fenómeno también ocurre en la producción artesanal.

La presencia y persistencia de algunas especies y serovares de *Listeria* asociados a fábricas de productos lácteos se relaciona con la persistencia de nichos y adaptación de *L. monocytogenes* a esos nichos (Ho *et al.* 2007 Keto-Timonen *et al.* 2007, Lomonaco 2009). Las medidas que pueden eliminar cepas persistentes son: reemplazar equipo, realizar modificaciones en instalaciones y líneas de producción (Keto-Timonen *et al.* 2007, Silva *et al.* 2003). El aislamiento de una cepa de *L. monocytogenes* en diferentes fechas en la quesería A (figura 8) y el aislamiento de *L. innocua* en la quesería B en fechas consecutivas (cuadro 4), soportan la posibilidad de cepas persistentes en queserías artesanales. En la quesería A, los chiquigüites fueron muestreados en una fecha adicional para explorar si había diferencia con lo encontrado un año antes, en el primer muestreo, fue sorprendente encontrar la misma especie y serotipo (cuadro 3). Aunque *Listeria monocytogenes* serotipo 1/2b inmóvil mostró el mismo pulsotipo observado para aislamientos de *L. monocytogenes* 1/2b (figura 8), no podemos asegurar que se trate de la misma cepa porque los patrones de PFGE no son serotipo específicos, por lo que un mismo patrón puede ser mostrado por varios serotipos y linajes (Gianfranceschi *et al.* 2007). Encontrar pulsotipos idénticos después de 15 o 20 meses en las queserías A y C (figura 8) así como el aislamiento intermitente de *L. innocua* en la quesería D, soportan la posibilidad de reintroducción a partir de una fuente de contaminación no identificada. También es posible que las queserías tengan ciertas condiciones que favorezcan el aislamiento de ciertas especies, serotipos o pulsotipos esto no pudo ser analizado en el presente trabajo.

En las muestras positivas de quesos, se aisló *Listeria monocytogenes* serotipos 1/2a, 1/2b y 4b. Esto es de importancia en salud pública, porque los serotipos mencionados son asociados frecuentemente a listeriosis transmitida por alimentos (Slutsker & Schuchat 1999), por lo cual los quesos artesanales de las queserías A y C podrían ser una fuente de casos de listeriosis.

L. monocytogenes strain from the cheese at Plant A on different dates (figure 8) and the isolation of *L. innocua* from cheese at Plant B on consecutive dates (table 4) support the possibility of persistence. In plant A, baskets were sampled one more order to determine if there were any differences between the isolates one year after the equipment was first sampled. Surprisingly, the same species and serotype were found (table 3). Although *L. monocytogenes* serotype 1/2b non-motile displayed the same pulsotype observed in the *L. monocytogenes* 1/2b isolates (figure 8), we cannot be sure it was from the same strain because PFGE profiles are not serotype-specific; thus, the same profile could be shared by different serotypes and lineages (Gianfranceschi *et al.* 2007). The facts that identical pulsotypes sampled 15-to-20 months apart were found in Plants A and C (figure 8) together with the intermittent isolation of *L. innocua* in Plant D support the possibility of reintroduction from a yet unidentified source of contamination. It is also possible that these plants present certain features that foster isolation of certain species, serotypes, or pulsotypes.

L. monocytogenes serovars 1/2a, 1/2b and 4b were found in positive cheese samples. This constitutes a public health concern because they are the ones most often associated with foodborne listeriosis (Slutsker & Schuchat 1999). Thus, the contaminated artisanal cheeses from Plants A and C could be sources of listeriosis cases.

Listeria was present in all these artisanal cheese plants, though isolation frequencies, species and serovars varied. The observations and results of our sampling study suggest that cheese contamination in artisanal plants could be explained by the high frequency of contamination in refrigerators and floors, fostered by the presence of open drains in processing areas. We assume that *Listeria* contamination during artisanal cheese production is a dynamic system in which cycles of contamination and elimination result from the interaction between the plant environment, specific characteristics of *Listeria* strains, sanitary practices, and inadequate personnel practices during processing. Using hot water and whey is one measure that could re-

Se aisló *Listeria* de queserías artesanales, su frecuencia, especies y serotipos variaron entre las queserías. De acuerdo con los resultados y las observaciones realizadas durante los muestreos, la contaminación del queso en plantas artesanales, podría explicarse por altas frecuencias de contaminación en refrigeradores y pisos, la cuál es favorecida por la presencia de drenajes abiertos en el área de procesamiento. La contaminación con *Listeria* durante la elaboración artesanal de queso es un sistema dinámico donde los ciclos de contaminación y eliminación son consecuencia de una interacción entre el medio ambiente de la quesería, características particulares de las cepas de *Listeria*, prácticas de limpieza, y prácticas erróneas del personal. El empleo de agua hirviendo y suero a 90 °C, en la limpieza de pisos, equipos y superficies es una práctica que podría reducir la frecuencia de contaminación con *Listeria* en queserías artesanales.

Agradecimientos

A los propietarios y trabajadores de las queserías por permitir los muestreos y responder todas nuestras preguntas. A Patricia Castro Félix y Anne Santerre Lucas por facilitarnos el sistema de documentación y sus consejos para el análisis de bandas. A Ofelia Vargas Ponce, por facilitarnos y orientarnos en el manejo del programa NTSYS. A Ewen C.D. Todd por alentarnos a escribir este artículo. A Servando Carvajal por sus observaciones para mejorar el manuscrito. El primer autor agradece al Fondo para la Modernización de la Educación Superior (FOMES) la beca empleada en la compra de las muestras de quesos. ❖

duce the frequency of *Listeria* contamination in artisanal cheese plants.

Acknowledgements

We are grateful to the owners and staff of the artisanal cheese plants for facilitating sampling and answering all our questions. We also thank Ewen C.D. Todd for encouraging us to write this article; Patricia Castro Felix and Anne Santerre Lucas for lending us their documentation system for banding analysis and for the advice and orientation given; Ofelia Vargas Ponce for lending us her NTSYS program and for her wise counsel; and Servando Carvajal for his comments that helped improve the typescript. The lead author thanks the *Fondo para la Modernización de la Educación Superior* (FOMES) for the Fellowship that made it possible to purchase the cheese samples.



Referencias | References

- ANGELIDIS, A.S., L.T. SMITH & G.M. SMITH. 2002.** Elevated carnitine accumulation by *Listeria monocytogenes* impaired in glycine betaine transport is insufficient to restore wild-type cryotolerance in milk whey. *International Journal of Food Microbiology* **75**: 1–9.
- ANNOUS, B.A., L.A. BECKER, D.O. BAYLES, D.P. LABEDA & B.J. WILKINSON. 1997.** Critical role of anteiso- C15:0 fatty acid in the growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3887–3894.
- BARRIGA ANGULO, G., E. ROMO RODRÍGUEZ, M. RAMÍREZ RODRÍGUEZ, E. CARREÓN VALDEZ & M.A. LÓPEZ VELARDE. 1981.** Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* (Informe de cinco casos). *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **19**: 519–525.
- BARRIGA ANGULO, G., C. ARRUMIR ESCORZA, N.F. MERCADO GONZÁLEZ, R. RAMÍREZ ORTIZ & E. LÓPEZ ORDUÑA. 2009.** Características clínicas y epidemiológicas de 3,183 casos de meningitis confirmados bacteriológicamente (1980/2007). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* **29**: 99–106.
- BONFIL, A.A., A.L. SÁNCHEZ, A.L. PINEDA & G.D. VILLANUEVA. 1990.** Listeriosis neonatal. Reporte de tres casos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **47**: 437–438.
- BONILLA SUÁREZ, J. & L. JASSO GUTIÉRREZ. 1983.** Septicemia por *Listeria monocytogenes* en el neonato (informe de un caso). *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social* **21**: 180–182.
- BUZBY, J.C., T. ROBERTS, C.T.J. LIN & J.M. MACDONALD. 2014.** Bacterial Foodborne Disease: Medical Costs and Productivity Losses, COI estimates of listeriosis. Agricultural Economics Report No. AER741. [Internet]. Aug 1996, last update 03 Jun 2012 [citado 22 May 2014]. Disponible en: <http://www.ers.usda.gov/publications/aer-agricultural-economic-report/aer741.aspx>
- CASTREJÓN ALBA, M. & T. MATEO BALMELLI. 1997.** Meningoencefalitis por *Listeria monocytogenes* en niños inmunocomprometidos. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **54**: 76–80.
- CHIARINI, E., K. TYLER, J.M. FARBER, F. PAGOTTO & M.T. DESTRO. 2009.** *Listeria monocytogenes* in two different poultry facilities: manual and automatic evisceration. *Poultry Science* **88**: 791–797.
- COX, L.J., J.L. CORDIER, C. CORDELLANA, P. KONKEL, C. PEDRAZZINI, R. BEUMER & A. SIEBENGA. 1989.** *Listeria* spp. in food processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiology* **6**: 49–61.
- CRAIG, D., B.C. AUSTIN, J. SOBEL, P.S. HAYES, W.F. BIBB, L.M. GRAVES, B. SWAMINATHAN, M.E. PROCTOR & P.M. GRIFFIN. 1997.** An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. *The New England Journal of Medicine* **336**: 100–105.
- DE CESARE, A., G. MANFREDA, M. MACRÌ & C. CANTONI. 2007.** Application of automated ribotyping to support the evaluation of *Listeria monocytogenes* sources in a taleggio cheese producing plant. *Journal of Food Protection* **70**: 1116–21.
- DEAN, A.G., T.G. ARNER, S. SANGAM, G.G. SUNKI, R. FRIEDMAN, M. LANTINGA, J.C. ZUBIETA, K.M. SULLIVAN & D.C. SMITH. 2000.** Epi Info™ 2000 a database and statistics program for public health professionals for use on Windows 95, 98, NT and 2000 computers. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA.
- DONNELLY, C.W. 1999.** *Conventional methods to detect and isolate Listeria monocytogenes*. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria, listeriosis and food safety*. pp. 225–260. New York: Marcel Dekker Inc.
- ESCÁRCEGA, H., R. PEÑALOZA, O. MONTES, R. PEÑA, H. GODOY, M. NEGRIN, R. RODRÍGUEZ & P. ANAYA. 1999.** Listeriosis materno-fetal: reporte de tres casos. *Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría*. **6**: 290–296.
- FERESU, S.B. & D. JONES. 1988.** Taxonomic studies on *Brochothrix*, *Erysipelothrix*, *Listeria* and atypical lactobacilli. *Journal of General Microbiology* **134**: 1165–1183.
- GIANFRANCESCO, M.V., A. GATTUSO, M.C. D’OTTAVIO, S. FOKAS & P. AURELI. 2007.** Results of a 12-month long enhanced surveillance of listeriosis in Italy. *Eurosurveillance* **12**(11): E7–8.
- GOULET, V., H. DE VALK, O. PIERRE, F. STAINER, J. ROCOURT, V. VAILLANT, C. JACQUET & J.C. DESENCLOS. 2001.** Effect of prevention measures on incidence of human listeriosis, France, 1987–1997. *Emerging*

- Infectious Diseases* 7: 983–989.
- GRACE, B., G.A. HOUGHTBY, H. RUDNICK & K. WHALEY. 1992.** Sampling dairy and related products. En: Marshall R.T. (Comps.), Standard methods for the examination of dairy products. pp. 59–83. Washington D.C: American Public Health Association.
- GRAVES, L.M. & B. SWAMINATHAN. 2001.** PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology* 65: 55–62.
- GRAVANI, R. 1999.** Incidence and control of *Listeria* in food-processing facilities. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria*, listeriosis and food safety. pp. 657–709. New York: Marcel Dekker Inc.
- GUERRA-MARÍA, M.M. & M.A. BERNARDO F. 1999.** Natural occurrence of *Listeria spp.* in traditional cheeses from Alentejo (Portugal). *Revista Portuguesa de Ciências Veterinarias* 94: 142–148.
- HITCHINS, A.D. 1995.** *Listeria monocytogenes*. En Food and Drug Administration (Comp.), Bacteriological Analytical Manual 8th edition. pp. 10.01–10.13. Arlington VA: AOAC International
- HO, A.J., R. LAPPI & M. WIEDMANN. 2007.** Longitudinal Monitoring of *Listeria monocytogenes* Contamination. *Journal of Dairy Science* 90: 2517–2524.
- JACQUET, C., J. ROCOURT & A. REYNAUD. 1993.** Study of *Listeria monocytogenes* contamination in a dairy plant and characterization of the strains isolated. *International Journal of Food Microbiology* 20: 13–22.
- KABUKI, D.Y., A.Y. KUAYE, M. WIEDMANN & K.J. BOOR. 2004.** Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in latin-style fresh-cheese processing plants. *Journal of Dairy Science* 87: 2803–2812.
- KETO-TIMONEN, R., R. TOLVANEN, J. LUNDÉN & H. KORKEALA. 2007.** An 8-year surveillance of the diversity and persistence of *Listeria monocytogenes* in a chilled food processing plant analyzed by amplified fragment length polymorphism. *Journal of Food Protection* 70: 1866–73.
- KERR, K.G., D. BIRKENHEAD, K. SEALE, J. MAJOR & P.M. HAWKEY. 1993.** Prevalence of *Listeria spp.* on the hands of food workers. *Journal of Food Protection* 56: 525–527.
- KO, R., L.T. SMITH & G.M. SMITH. 1994.** Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and criotolerance on *Listeria monocytogenes*. *Journal of Bacteriology* 176: 426–431.
- LINNAN, M.J., L. MASCOLA, X.D. LOU, V. GOULET, S. MAY, C. SALMINEN, D.W. HIRD, M.L. YONEKURA, P. HAYES, R. WEAVER, A. AUDURIER, B.D. PIKAYTIS, S.L. FANNIN, A. KLEKS & C.V. BROOME. 1988.** Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *The New England Journal of Medicine* 319: 823–828.
- LOMONACO, S., L. DECASTELLI, D. NUCERA, S. GALLINA, D. MANILA BIANCHI & T. CIVERA. 2009.** *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola: subtypes, diversity and persistence over time. *International Journal of Food Microbiology* 128: 516–20.
- LOU, Y. & A.E. YOUSEF. 1999.** Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria*, listeriosis and food safety. pp. 131–224. New York: Marcel Dekker Inc.
- LUIS-JUAN MORALES, A. 1994.** *Listeria monocytogenes* en productos lácteos y su importancia en la salud pública. Tesis de maestría. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara.
- MATURIN, L.J. 1995.** *Inhibitory substances in milk*. En Food and Drug Administration (Comp.), Bacteriological Analytical Manual 8th edition. pp. 20.01–20.06. Arlington VA: AOAC International.
- MCLAUCHLIN, J., M.H. GREENWOOD & P.N. PINI. 1990.** The occurrence of *Listeria monocytogenes* in cheese from a manufacturer associated with a case of listeriosis. *International Journal of Food Microbiology* 10: 255–262.
- MONTES O., M. G., G. RODRÍGUEZ, P. CASAUBÓN, C.L. ALDRETE, H.L. MOLINAR, R. ANGELES, R. HERNÁNDEZ & R. PEÑA. 1999.** Listeriosis neonatal: reporte de un caso. *Revista Mexicana de Puericultura y Pediatría*. 6: 240–244.
- MORENO-ENRIQUEZ, R. I., A. GARCIA-GALAZ, E. ACEDO-FELIX, I.H. GONZALEZ-RÍOS, J.E. CALL, J.B. LUCHANSKY & M.E. DIAZ-CINCO. 2007.** Prevalence, types, and geographical distribution of *Listeria monocytogenes* from a survey of retail Queso Fresco and associated cheese processing plants and dairy farms in Sonora, Mexico. *Journal of Food Protection* 70: 2596–2601.

- OTERO MENDOZA, F.J., V. MONROY COLÍN, A. CARRANCO, J.A. DUEÑAS, F. MACKINNEY NOVELLO, G.E. ESTUDILLO JIMÉNEZ & N. GONZÁLEZ SALDAÑA. 2011.** Meningitis bacteriana por *Listeria monocytogenes* presentación de un caso y revisión de literatura. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría XXIV(95)*: 118–120.
- PRITCHARD, T.J., C.M. BELIVEAU, K.J. FLANDERS & C.W. DONNELLY. 1994.** Increased incidence of *Listeria* species in dairy processing plants having adjacent farm facilities. *Journal of Food Protection* **57**: 770–775.
- PRIEST, F. & B. AUSTIN. 1993.** *Modern Bacterial Taxonomy*. England: Chapman and Hall.
- RENALDI, J., F. BRITO, E. SANTOS, E. ARCURI, C.C. LANGE, M.A. BRITO, G.N. SOUZA, M.M. CERQUEIRA, J.M. BELTRAN, J.E. CALL, Y. LIU, A.C. PORTO-FETT & J.B. LUCHANSKY. 2008.** Retail survey of brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 4954–4951.
- ROHLF, F.J. 2009.** *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis Systems. Version 2.2E*. (United States of North America: Exeter Publishing Ltd).
- RYSER, E.T. 1999.** *Incidence and behavior of Listeria monocytogenes in unfermented dairy products*. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria*, listeriosis and food safety. pp. 299–358. New York: Marcel Dekker Inc.
- SCALLAN, E., R.M. HOEKSTRA, F.J. ANGULO, R.V. TAUXE, M.A. WIDDOWSON, S.L. ROY, J.L. JONES & P.M. GRIFFIN. 2011.** Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerging Infectious Diseases* **17**: 7–15.
- SECRETARÍA DE SALUD. 2013.** Norma Oficial Mexicana NOM-017-SSA2-2012, para la vigilancia epidemiológica. Diario Oficial de la Federación. México D.F. 19 de febrero de 2013.
- SEELIGER, H.P.R. & K. HÖHNE. 1979.** *Serotyping of Listeria monocytogenes and related species*. En T. Bergan and J.R. Norris (Comps.), *Methods in Microbiology*. pp. 33–48. New York: Academic Press.
- SEELIGER, H.P.R. & D. JONES. 1986.** *Genus Listeria Pirie, 1940, 383AL*. En P.H.A. Sneath, H.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (Comps.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. pp. 1235–1245. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.
- SILVA, I.M., R.C. ALMEIDA, M.A. ALVES & P.F. ALMEIDA. 2003.** Occurrence of *Listeria* spp. in critical control points and the environment of Minas Frescal cheese processing. *International Journal of Food Microbiology* **81**: 241–248.
- SLADE, P.J. 1992.** Monitoring *Listeria* in the food production environment: I detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. *Food Research International* **25**: 45–56.
- SLUTSKER, L. & A. SCHUCHAT. 1999.** Listeriosis in humans. En Elliot T. Ryser and Elmer H. Marth (Comps.), *Listeria*, listeriosis and food safety. pp. 75–96. New York: Marcel Dekker Inc.
- SOLORZANO-SANTOS, F., J.L. ARREDONDO-GARCÍA, E. UDAETA-MORA, F.J. ORTIZ-IBARRA, G. ECHANIZ-AVILES & M. BELTRAN-ZUÑIGA. 1989.** Infección sistémica neonatal por *Listeria monocytogenes*. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México* **46**: 709–714.
- TOMPKIN, R.B. 2002.** Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *Journal of Food Protection* **65**: 709–725.
- VÁZQUEZ-VILLANUEVA, J., B. ORGAZ, S. ORTIZ, V.LÓPEZ, J.V.MARTÍNEZ-SUÁREZ & C. SANJOSE. 2010.** Predominance and persistence of a single clone of *Listeria ivanovii* in a Manchego cheese factory over 6 months. *Zoonoses and Public Health* **57**: 402–10.
- WELLS, J.G., G.K. MORRIS & P.S. BRACHMAN. 1971.** New method of isolating *Salmonellae* from milk. *Applied Microbiology* **21**: 235–239.
- WING, E.J. & S.H. GREGORY. 2002.** *Listeria monocytogenes*: clinical and experimental update. *The Journal of Infectious Diseases* **185**: S18–S24.
- YDE, M. & A. GENNICOT. 2004.** Use of PFGE to characterize clonal relationships among Belgian clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Medical Microbiology* **53**: 399–402.