

***Listeria monocytogenes* en queso amarillo madurado tipo Edam y su resistencia al pH y salinidad**

Ennis Rodríguez González¹, Lilibeth Cabrera Salas¹, Gisela Colina Phillips¹

1. Laboratorio de Microbiología, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias. Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Correspondencia: cabrerailibeth@gmail.com

Recibido: 17-03-09 / Aceptado: 21-05-09

Resumen

Los quesos, productos lácteos de alta demanda, se han encontrado recientemente involucrados en casos de intoxicación e infecciones alimentarias causadas, en su gran mayoría, por agentes microbianos como *Listeria monocytogenes*, debido a factores como su amplia distribución en la naturaleza, su resistencia a pH, salinidad y temperatura. Se analizaron 48 muestras de queso amarillo madurado tipo Edam, obtenidas de dos abastecimientos comerciales en el municipio Maracaibo y San Francisco del estado Zulia, Venezuela, utilizando Agar Palcam y Oxford. Se hicieron ensayos de resistencia a valores de pH de 4, 5, 6, 6.5 y 7 y salinidad de 1, 2, 3, 4 y 5% (p/v).

De las 48 muestras de queso, 7 (15%) fueron positivas para el género *Listeria* spp. Las pruebas preliminares (microscópicas y bioquímicas) confirmaron 11 colonias (C1 a C11) con características del género *Listeria*. De las once colonias fueron identificadas cinco *L. welshimeri* (46%), tres *L. grayi* (27%), dos *L. innocua* (18%) y una cepa como *L. monocytogenes* (9%), la cual mostró resistencia a valores de pH ≥ 4 , y fue afectada gradualmente a las concentraciones de sal. La presencia de este microorganismo en un alimento del alto consumo como el queso, representa un alerta en cuanto a los sistemas de gestión de inocuidad llevados a cabo en tales alimentos.

Palabras clave: conservación de alimentos, industria alimenticia, *Listeria monocytogenes*, listeriosis, salinidad.

Abstract

***Listeria monocytogenes* in Ripened Cheddar Cheese Edam Type and its Resistance to pH and Salinity**

Cheeses, high demand dairy products, have been recently involved in cases of food poisoning and infections caused, overwhelmingly, by microbial agents such as *Listeria monocytogenes*, due to factors such as their wide distribution in nature, pH resistance, salinity and temperature. We analyzed 48 samples of mature cheddar cheese Edam type, obtained from two commercial supplies in the Maracaibo and San Francisco municipality, Zulia state, Venezuela using Palcam and Oxford Agar. Strength tests were made at pH values of 4, 5, 6, 6.5 and 7 and salinity of 1, 2, 3, 4 and 5% (w / v).

Of the 48 samples of cheese, 7 (15%) were positive for the genus *Listeria* spp. Preliminary tests (microscopic and biochemical) confirmed 11 colonies (C1 to C11) with characteristics of the genus *Listeria*. Out of the eleven colonies, five were identified: *L. welshimeri* (46%), three *L. grayi* (27%), two *L. innocua* (18%) 4, and one strain was identified as *L. monocytogenes* (9%), which was resistant to pH ≥ 4 and gradually affected the concentrations of salt. The presence of this organism in a high consumption of food like cheese is a warning as to the safety management systems carried out in such foods.

Keywords: food preservation, food processing, *Listeria monocytogenes*, listeriosis, salinity

Introducción

Los quesos, como productos lácteos de alta demanda, se han encontrado involucrados en casos de infecciones alimentarias donde la *Listeria monocytogenes* es una de los agentes responsables (1,2) y se ha presentado con tasas de mortalidad entre 20 y 30% (3), las más altas de todas las infecciones alimentarias, siendo en la mayoría de los casos el alimento involucrado de origen lácteo. Desde mediados del siglo XX, dicha bacteria se considera un patógeno emergente en alimentos, mostrando habilidad de multiplicarse en leche, en carne y vegetales almacenados en refrigeración, siendo la principal vía de infección de listeriosis humana (1). Entre las graves manifestaciones clínicas características de esta enfermedad, tenemos meningitis y/o encefalitis, abortos o infecciones neonatales y septicemias (4).

El género *Listeria* contiene especies con una extensa distribución en ambientes como tierra, aguas de desecho y fluviales, afluentes y hasta en plantas de tratamiento de aguas servidas. Además, se puede encontrar en aves, pescados, moluscos, crustáceos, insectos, leche, productos cárnicos, frutas y vegetales (5). En el caso de *L. monocytogenes*, éste patógeno tiene la capacidad de desarrollarse a temperaturas de refrigeración, en presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio y resistir altas temperaturas de tratamiento (1,6). Se ha llegado a detectar dicha bacteria, en las plantas de procesamiento y en ambientes refrigerados, por lo que puede ser transmitida al humano a través de la ingestión de alimentos que se contaminan durante cualquier paso en la cadena de producción (7), lo que confiere una importante oportunidad para contaminarlos.

Según la industria y los gobiernos, se deben tratar a todas las cepas de *L. monocytogenes* como potencialmente patógenas, aunque pueden variar según su grado de virulencia, siendo deseable su ausencia en la cadena de producción de alimentos, mientras sea posible, manteniendo condiciones que inhiban su multiplicación en los alimentos, a través de mecanismos de buenas prácticas de manufactura.

En Venezuela el queso amarillo tipo Edam es un alimento de origen neerlandés de alto consumo por la población a nivel nacional, es elaborado con leche pasteurizada y cultivos lácticos que le proporcionan

su característica particular de sabor, aroma, blandura y acidez. La normativa venezolana COVENIN describe como determinaciones microbiológicas a realizar, aquellas referidas a coliformes, mohos y levaduras y especies patógenas como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella* spp. (8). En países de Europa y Estados Unidos *L. monocytogenes* está incluida dentro de los parámetros de control de calidad de los quesos y productos lácteos. Dada la importancia de la *L. monocytogenes* en alimentos, se planteó el presente estudio con el fin de evaluar su presencia en un queso de alto consumo en el estado Zulia, como es el Edam.

Materiales y métodos

Toma de muestras de queso

Cuarenta y ocho muestras de queso amarillo madurado tipo Edam fueron obtenidas, en forma aleatoria, de dos abastecimientos comerciales, ubicados uno en el municipio Maracaibo y el otro en el municipio San Francisco, ambos del estado Zulia. De cada establecimiento se adquirieron dos muestras semanales de 100 g cada una, durante 3 meses. Las muestras se colocaron en bolsas plásticas transparentes con cierres herméticos y transportados en cava con hielo ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) hasta el laboratorio, para su inmediato procesamiento.

Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

El aislamiento de *L. monocytogenes* se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por la FDA (8,10) donde se hizo un enriquecimiento de 25g de cada muestra de queso, licuado en 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* spp. (LEB- Merck®), e incubado durante 48 h a 30°C . A partir de este medio se realizaron siembras por estrías hasta agotamiento en la superficie de placas de petri con dos medios selectivos: Agar Oxford (Oxoid®, Basingstoke-England) suplementado con componentes selectivos como cicloheximida (400mg/L), sulfato de colistina (20mg/L), acriflavina (5mg/L), cefotetan (2mg/L) y fosfomicina (10mg/L) y Agar Palcam (Merck®-Germany), suplementado con polimicina B (10mg/L) y ceftazidima (20mg/L).

Las placas con agar Oxford y Palcam fueron incubadas entre 24-48h a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, y después de éste periodo, fueron examinadas para la detección de colonias

características de 2 mm de diámetro (negras o gris pardo con un halo negro en el medio Oxford y verde grisáceas con centro hundido de color negro y un halo negro a su alrededor en el medio Palcam). Se seleccionaron no menos de cinco colonias típicas de cada medio, a las cuales se le evaluaron: morfología, motilidad por la técnica de gota pendiente y producción de catalasa en lámina y coloración de Gram utilizando un microscopio binocular OLYMPUS optical Co. LTD (Taiwan), modelo CHK. Las colonias compatibles con *Listeria* spp. fueron reisladas en placas con agar tripticasa de soya (Oxoid®) para su purificación y mantenidas en tubos inclinados con agar tripticasa de soya (Oxoid®) suplementado con 0,6% de extracto de levadura (TSA+YE), con incubación a 30° C por 24 horas, hasta su uso en las pruebas de identificación.

Identificación de *Listeria monocytogenes*

La identificación de las especies de *Listeria* se basó en las pruebas bioquímicas referidas en la FDA (10) y Manual de Bergey's (11) que incluyen: prueba de catalasa con un cultivo joven de la bacteria (18h a 30°C) y solución de peróxido de hidrógeno al 30%; hidrólisis de la urea, gelatina, reducción de nitratos, Voges-Proskauer; fermentación de glucosa, maltosa, manitol, ramnosa y xilosa en caldo púrpura bromo cresol al 0.5%; motilidad en tubo con medio semi-sólido para la observación del crecimiento en forma de paragua a 3-5 mm por debajo de la superficie del medio, típica para el género *Listeria*.

Después de una incubación a 25°C durante 24 a 48h; se determinó la actividad hemolítica mediante punción en placas de agar sangre de equino fresca al 5% con incubación a 37°C por 24-48h, donde una prueba positiva en la observación de una zona hemolítica tipo β ; prueba de CAMP (Christie-Atkins-Munch-Peterson) (12), utilizando un cultivo de *S. aureus* hemolítico ATCC 25923, con una observación de una zona hemolítica tipo β , entre la cepa de *S. aureus* y cada una de las cepas de *Listeria* spp. sujetas a estudio, como prueba positiva; prueba de iluminación con luz oblicua de Henry (10), utilizando placas con agar tripticasa de soya suplementada con 0.6% de extracto de levadura, en una lupa marca Olympus, modelo S260 con un filtro LBD-2N y luz blanca, al cual se le verificó el ángulo de 45° con un angulometro.

La positividad estuvo representada por la presencia de colonias con una tonalidad azulada, según lo señalado en el manual de Bergey's (13). En las pruebas de identificación se utilizó una cepa control de *L. monocytogenes* codificada y donada por el Centro de Referencia Bacteriológica del Hospital Universitario de Maracaibo, Estado Zulia.

Resistencia de *Listeria monocytogenes* a la acidez y salinidad

Para el ensayo de resistencia a la acidez, se prepararon soluciones de trabajo en tubos de ensayos con 9 mL de leche descremada ultrapasteurizada (LDUP) y ajustada asépticamente a valores de pH de 4, 5, 6 y 6.5 utilizando ácido láctico esterilizado por filtración con membrana de ester de celulosa 0.22 μ m (ADVANTEC MFS, Inc., EE.UU.). Se inocularon, por duplicado con 100 μ L (v/v) de un cultivo joven (18h a 30°C) de la cepa de *Listeria monocytogenes* mantenida en caldo TSA+YE. Los tubos fueron incubados a 30°C por 18 h bajo condiciones aeróbicas en un baño de agua.

El procedimiento para la determinación de la resistencia a valores de salinidad (NaCl, v/v), se hizo con una solución stock al 10% con la que fue inoculada una serie de tubos con 9 mL de LDUP estéril (por duplicado) hasta obtener porcentajes del 1, 2, 3, 4 y 5% de NaCl (p/v). Luego fueron inoculados con 100 μ L (v/v) de un cultivo joven (18 h a 30°C) de *L. monocytogenes*.

El grado de resistencia se evaluó en base a la producción de acidez titulable (mL NaOH, 0.1N/100ml), en 10 mL de muestra, comparado con el control de LDUP sin inocular, y utilizando como indicador 1mL de fenolftaleína al 0.5% en solución alcohólica hasta aparecer una tonalidad rosada (14). Como controles se utilizaron tubos con LDUP sin inocular, tubos con LDUP inoculada con la cepa de *L. monocytogenes* obtenida del HUM y tubos con las soluciones de trabajo de pH y salinidad sin inocular.

Resultados

De las cuarenta y ocho muestras de queso amarillo madurado tipo Edam analizadas, siete (15%) resultaron positivas para el género *Listeria*, donde el abastecimiento del municipio Maracaibo mostró un 57% y el de San Francisco un 43%, Tabla 1. De los siete quesos se

aislaron 72 colonias de las cuales 11 (15%) resultaron con características bioquímicas propias del género *Listeria*, como bacilos cortos Gram positivos, móviles en forma de tirabuzón (en gota pendiente), productoras de catalasa, rojo de metilo y Voges-Proskauer positivo; reducción de nitrato y urea negativa. En la Tabla 2 se presentan las pruebas bioquímicas diferenciales entre especies, donde los carbohidratos de mayor diferenciación resultan xilosa, rhamnosa y manitol (10, 15).

El medio selectivo Palcam fue más efectivo que el Oxford, en cuanto al color y tamaño de las colonias típicas: verde grisáceo con un halo marrón-negro de 1 a 2 mm de diámetro y al número desarrollado. En el agar Oxford las colonias fueron más pequeñas de lo usual y en algunos casos la coloración típica no resultó bien definida y además presentaron numerosas colonias acompañantes de color amarillo, correspondientes a bacilos largos en

cadenas, al ser vistos bajo el microscopio. El crecimiento en forma de paragua en el medio semisólido sólo se observó en las cepas 2, 5 y 10, donde C2 y C10 correspondieron a *L. innocua* y C5 a *L. monocytogenes*, Tabla 2. Este tipo de crecimiento en paragua es específica para *L. monocytogenes* y *L. innocua* (10,16). Mediante la prueba de iluminación de Henry, las once colonias aisladas de *Listeria* mostraron una tonalidad azul característica del género (13).

La actividad hemolítica de las cepas aisladas resultó notoria con sangre de caballo; estos resultados coinciden con los reportados por Citti y colaboradores (17), y a través de ella se logró la diferenciación de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* y *L. grayi*, que son no hemolíticas. La hemólisis tipo β en la prueba de CAMP también confirmó *L. monocytogenes*, la cual descarta especies no hemolíticas (*L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. grayi* y *L. welshimeri*) de las hemolíticas

Tabla 1. Porcentaje de *Listeria* spp. presente en las muestras de queso analizadas.

Municipio	colectadas		
		Nº	%
Maracaibo	24	4/24	57
San Francisco	24	3/24	43
Total	48	7/48	15

Tabla 2. Pruebas bioquímicas características para la identificación de las especies de *Listeria* aisladas de queso amarillo madurado tipo Edam.

Cepa	CAMP	β -H	Glucosa	Maltosa	Manitol	Rhamnosa	Xilosa	Especie
C1	-	-	+	+	+	+	-	<i>L. g</i>
	-	-	+	+	-	-	-	<i>L. i</i>
C3	-	-	+	+	+	-	-	<i>L. g</i>
	-	-	+	+	-	-	+	<i>L. w</i>
C5	+	+	+	+	-	+	-	<i>L. m</i>
	-	-	+	+	-	-	+	<i>L. w</i>
C7	-	-	+	+	-	-	+	<i>L. w</i>
	-	-	+	+	-	-	+	<i>L. w</i>
C9	-	-	+	+	+	+	-	<i>L. g</i>
	-	-	+	+	-	-	-	<i>L. i</i>
C11	-	-	+	+	-	-	+	<i>L. w</i>
Control	+	-	+	+	-	+	-	<i>L. m</i>

CAMP= Christie-Atring-Munch-Peterson; β -H= beta hemólisis; C1 a C11= colonias aisladas en el presente estudio. L. w= *Listeria welshimeri*; L. m= *Listeria monocytogenes*; L. g= *Listeria grayi*; L. i= *Listeria innocua*; Control= cepa de *Listeria monocytogenes* codificada y donada por el Laboratorio de Referencia Bacteriológico del Hospital Universitario de Maracaibo.

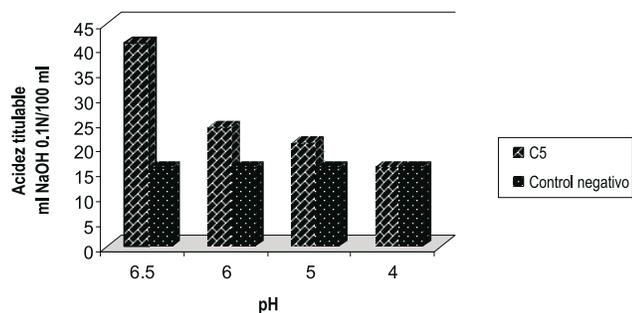


Figura 1. Valores de acidez titulable de la cepa de *Listeria monocytogenes* a diferentes niveles de pH.

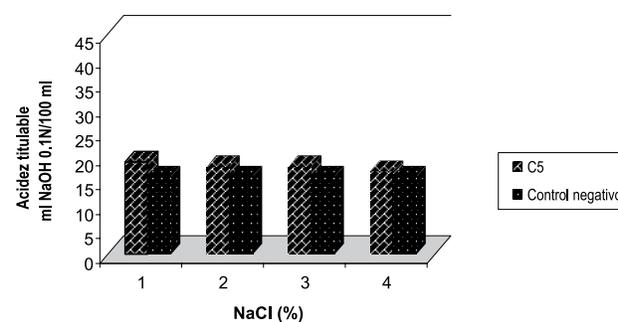


Figura 2. Valores de acidez titulable de la cepa de *Listeria monocytogenes* a diferentes concentraciones de cloruro de sodio.

(*L. monocytogenes* y *L. seeligeri*) en presencia de *S. aureus* (13).

En general se identificaron cuatro especies de *Listeria* con los porcentajes de 46% (5/11 colonias) de *L. welshimeri*, 27% (3/11) de *L. grayi*, 18% (2/11) de *L. innocua* y 9% (1/11) de *L. monocytogenes*. La proporción de estas especies por muestras de queso positivas (n=7) estuvo en el orden de 14% (1/7) de *L. monocytogenes* y de 43% (3/7), 29%(2/7) y 14% (1/7) de las especies *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. innocua*, respectivamente. Tomando en cuenta el número total de quesos analizados la prevalencia en porcentaje de *L. monocytogenes* fue de 2% (1/48).

En las Figuras 1 y 2, aparecen los valores de acidez titulable para el caso de resistencia a diferentes valores de pH y salinidad, respectivamente. En la Figura 1 se observa que la cepa de *L. monocytogenes* (C5) mostró crecimiento a valores de pH entre 5 y 6.5. A pH 4 resultó inhibida en su crecimiento. En la Figura 2, se observa como la cepa C5 fue débilmente afectada a medida que se incrementaba la salinidad, pero sin lograr su total inhibición.

Discusión

Son varios los estudios donde se resaltan la prevalencia de *Listeria* spp. en queso. Villalobos y Martínez (18) reportaron una prevalencia del 16.6 % en 10/60 muestras de quesos blancos frescos en la ciudad de Cumaná, Venezuela. Por otro lado, Carrillo y Zambrano (19) mencionaron valores de 9.25% utilizando el método de aislamiento secundario de la FDA y de un 16.66% con el método rápido TECRA, en quesos expendidos en la ciudad de San Cristóbal, Venezuela. En quesos frescos colombianos se ha llegado a encontrar valores de 16.7% (20), 16.8% (21) y de 22.58% (22). Martino y colaboradores (23) mencionaron una incidencia del 5.6

% en quesos semiduros pasteurizados comercializados en Cuba. En Europa la prevalencia de *Listeria* spp. es del 75% en quesos de Portugal (24) y del 15.8% (25) en quesos tipo mancha roja.

En cuanto a la prevalencia mundial de *L. monocytogenes* en leche y productos lácteos, se observa que en leche cruda está alrededor del 2.2% (26,27). En países europeos se ha llegado a detectar en porcentajes entre el 0%-6%. En España se ha reportado en un 3.6% en leche cruda (28) y en Italia en un 2% en quesos madurados (29). El-Marrakchi y colaboradores (30) reportaron una prevalencia de 5.2% en muestras de queso fresco tipo Jben, un queso tradicional de fabricación artesanal a partir de leche cruda en Marruecos. En quesos suaves de la provincia de Beira Baixa, Portugal, se encontró en niveles considerables de 46% (29/63) (24).

En Canadá, EE.UU. y México la prevalencia de *L. monocytogenes* varían entre 0% y 12% (31,32). Reuben y colaboradores mencionan porcentajes de incidencia del 5.4% en Canadá. En México se ha reportado su ausencia (33). En países de Suramérica como Perú se han detectado en porcentajes de 4.05% (34) y del 6.34% (35) en muestras de queso frescos de producción artesanal en la ciudad de Lima. En Antioquia, Colombia, se han encontrado porcentajes de *L. monocytogenes* del 78.3%, 15%, 29.6% y 33.1% (36).

En quesos blancos artesanales del mercado de Cáqueza de la ciudad de Cundinamarca (Colombia), se han reportados prevalencia del 80% de dicha bacteria (37), mientras que en quesos frescos (queso de hoja y cuajada) y quesos doble crema distribuidos en el municipio de Pamplona al norte de Santander, Colombia, se reportaron valores del 35.5% (21). Quesos costeños colombianos

resultaron con una prevalencia de 22.58% (22). Schöbitz y colaboradores (15) resaltan niveles de incidencia de 22% en 50 muestras de leche cruda en Chile.

En quesos semiduros pasteurizados cubanos se ha presentado con una prevalencia de un 5.6% (23). En Venezuela *L. monocytogenes* ha sido reportado en niveles del 2% en quesos blancos tipo llanero y en leche cruda (17) y de 17.5% en una gran variedad de quesos blancos (38). Carrillo y Zambrano (19) en un estudio realizado en quesos blancos semiduros obtenidos en expendios de la ciudad de San Cristóbal, no lograron el aislamiento de dicha bacteria. En el presente estudio, los resultados de prevalencia de dicha bacteria, muestra valores que están en concordancia con datos encontrados por algunos investigadores.

En relación a los medios de cultivos utilizados en esta investigación, se observó diferencias marcadas en cuanto a la recuperación de colonias típicas de *Listeria* spp. El medio Palcam resultó el más adecuado y en este sentido, investigadores como De Curtis y colaboradores (12) y Garzoroli y Rondinini (39) describen al medio Palcam como muy selectivo para el aislamiento y recuperación de *Listeria* spp. en productos lácteos. No obstante, hay quienes resaltan al medio Oxford como de mayor selectividad para los alimentos analizados (40,18). Realmente los laboratorios de alimentos utilizan para el aislamiento de *Listeria* spp. protocolos que incluyen ambos medios, con el fin de garantizar una mayor recuperación de especies.

El bajo porcentaje de *Listeria monocytogenes* encontrado con respecto a otras investigaciones, no deja de ser un alerta a la población consumidora. Es un bacilo intracelular, que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (6), siendo más resistente a diversas condiciones ambientales que muchas otras bacterias patógenas no esporuladas, transmitidas por los alimentos (41). *L. monocytogenes* es causante de la enfermedad conocida como listeriosis que afecta a poblaciones sensibles como mujeres embarazadas, recién nacidos, ancianos, pacientes con enfermedades neoplásicas y personas inmuno comprometidas (42), debido al consumo de alimentos de naturaleza láctea o no láctea.

L. monocytogenes es un patógeno multisistémico que puede infectar un amplio rango de tejidos del hombre, teniendo preferencia por el útero grávido y el sistema

nervioso central (6). Si bien la mayoría de los casos de enfermedad se deben al consumo de leche no pasteurizada o subproductos elaborados con la misma, los brotes ocurridos a pesar de la pasteurización dejan claro que este proceso no elimina el riesgo de contaminación posterior y por lo tanto, los alimentos pasteurizados conllevan el mismo peligro que la leche cruda (4).

Las posibles fuentes de contaminación con especies de *Listeria* incluyen el uso de leche no pasteurizada o bien por fallas en la manipulación del producto final, sobre todo en quesos elaborados de forma artesanal (43). La pasteurización incorrecta de la leche y su contaminación posterior son las explicaciones más probables de la presencia de patógenos en la leche pasteurizada, que a su vez han estado involucrados en brotes de listeriosis (42). Se ha demostrado que ciertas cepas de *L. monocytogenes* tienen la capacidad de sobrevivir temperaturas de pasteurización ya sean a 71.7°C durante 15 segundos o a 62.5°C durante 30 minutos, permitiendo la sobrevivencia y multiplicación de las mismas (44). Pero en general, una pasteurización a 72°C durante 15 o más segundos, son suficientes para destruir el bajo número de células de *L. monocytogenes* presentes en la leche cruda. No obstante, el proceso térmico no garantiza la eliminación total de cargas elevadas de este patógeno en un alimento (34), ya que no se descarta el hecho de que dicha bacteria en ocasiones pueda resistir tratamientos térmicos satisfactorios (6).

Otra fuente de contaminación es a través de los equipos, donde se ha observado que los sanitizantes comúnmente utilizados para higienizar los equipos pasteurizadores no son totalmente eficaces para destruir dicha bacteria patógena, debido a su característica de adherencia a goma y teflón, de allí que resulten, en ciertos casos, con baja efectividad los procesos de sanitización llevados en planta (45). Sin embargo, resulta importante la valoración de *Listeria* spp. para la verificación de los procesos adecuados de sanitización en la industria de alimentos.

La presencia de *L. monocytogenes* en productos alimenticios, en resumen, es quizás debida: a) la alta resistencia que muestra en leche cruda que ha sido refrigerada por un periodo largo de tiempo (31), b) alta resistencia térmica por la presencia de un sistema de proteínas que se activan frente al shock térmico, al ser expuesta la bacteria a temperaturas subletales previo al

tratamiento térmico (46), c) a la habilidad de invadir células y no ser afectadas por los ácidos de los macrófagos y d) a la resistencia térmica de la bacteria, al protegerse dentro de glóbulos de grasa, en alimentos como crema y leche entera (34). Dadas estas características y el hecho de ser ubicua, esta bacteria tiene muchas oportunidades de entrar a las líneas de producción de alimentos y colonizar (en 1 a 10% causa portación transitoria) o enfermar a quienes los ingieren (37).

En relación a la resistencia que puede mostrar *L. monocytogenes* frente al pH, se menciona que puede resistir valores de pH de 4.78 (17) donde puede mostrar una disminución en la recuperación de células viables cuando han sido sometidas a refrigeración (47). En general *L. monocytogenes* puede crecer a un amplio rango de pH que está entre 4.3 y 9 (42, 48). Hay estudios donde se reporta que el valor mínimo de pH que permite la supervivencia de especies del género *Listeria*, a una concentración de 10^4 UFC/g, resulta 4.66 a una temperatura de crecimiento de 30°C (49). Estas bacterias se adaptan a condiciones ácidas, mediante el fenómeno de respuesta ácido tolerante (ATR), logrando incluso sobrevivir a pH de 3.87 (50). La capacidad que muestran las especies del género *Listeria* para crecer a pH también está influenciada por la naturaleza del acidulante. Así en medios acidificados con ácido láctico no se detecta crecimiento hasta pH de 4.8 (51).

L. monocytogenes en medio BHI (Merck-Caldo Infusión Cerebro Corazón) acidificado con ácido láctico, ha mostrado sensibilidad térmica a valores de pH de 5.4, en comparación con valores de pH de 7.0 (52). Es así como en la producción de lácteos fermentados, donde el pH es bajo, hay la disminución del crecimiento de *L. monocytogenes* (4). También el factor pH en los procesos de sanitización de superficies, contribuye a la efectividad de los mismos, contra especies patógenas como *L. monocytogenes* (53-54).

El ensayo de resistencia a concentraciones de sal, reveló que concentraciones de sal entre 4% y 6% no resultan inhibitorias para *L. monocytogenes*, sin embargo, puede notarse en la Figura 6, que el crecimiento en función a la producción de acidez titulable, resultó bajo con respecto al observado en el ensayo del pH, Figura 1, donde no hubo valores por encima de 25. Cole y colaboradores (49),

Iriarte y Villanueva (55) indican que la concentración de NaCl requerida para el crecimiento de *Listeria* spp. está entre 2-3 a 10°C, siendo la temperatura un factor que influye en ello.

Además, ciertas cepas han podido sobrevivir durante un año en soluciones con 16% de NaCl (56) y por 4 meses con 25.5% (48). Según Sorrells y Enigl (11), encontraron que *L. monocytogenes* fue capaz de crecer a concentraciones de NaCl de 10% a 35°C y a 12% a 25°C, donde los valores mínimo de pH y sal para la iniciación del crecimiento del *L. monocytogenes* ocurren a 5% y 8%, respectivamente, a una temperatura de crecimiento de 35°C. En quesos blancos dicha bacteria se ha aislado a concentraciones de 0.99% y de 7.60% de sal y a pH entre 3.81 a 7.10 (18), mientras que en quesos semiduros toleran concentraciones entre 10-14% (4). No obstante, se ha llegado a reportar que dicha bacteria resulta inhibida a niveles de cloruro de sodio superiores a 6% (54).

Es importante señalar que la presencia de otras especies del género *Listeria* tales como *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. innocua*, encontradas en los quesos objetos de estudio, que quizás estén asociadas con prácticas inadecuadas de elaboración, almacenamiento y transporte de dicho alimento. Dichas especies se encontraron en valores mayores a los reportados por otros investigadores (18,22,40,57). Resultados contrarios son indicados por Villalobos y Martínez (18) en relación a *L. innocua*, donde mostró una prevalencia de un 50%. Baquero y Bernal (20) encontraron esta misma especie en el 20% de muestras de quesos blancos artesanales en Cáqueza, Colombia. De la especie *L. innocua* se dice que es un indicador de procesos deficientes de desinfección y pese a no ser patógena no significa que no pueda estar involucrada en la transmisión de genes de resistencia a antibióticos (22). Su hallazgo en el presente estudio, podría demostrar condiciones de producción y expendio inadecuadas que inciden en el consumo seguro del queso tipo Edam.

Los resultados obtenidos en los quesos amarillos madurados tipo Edam, podrían ser indicativos de contaminación durante el procesamiento, donde dicha bacteria es posible que se encuentre en la leche como materia prima, en las superficies de trabajos, o incluso en las manos de los operarios, debido a su capacidades intrínsecas de resistencia a agentes inhibidores como el pH

y la salinidad, lo cual sugiere la puesta en práctica, de una mejor gestión de inocuidad por parte de los industriales, donde el sistema HACCP y sus programas prerrequisitos, como son las buenas prácticas de manufacturas, estén incorporados como control de higiene alimentaria que contribuya a preservar la salud del consumidor, ante una infección que este microorganismo puede causar, especialmente en poblaciones de alto riesgo, como son las mujeres embarazadas, los ancianos y los inmuno comprometidos.

Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de la Universidad del Zulia, Venezuela, por el financiamiento que hizo posible la presente investigación.



Referencias

- Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991;55:476-511.
- Kells J, Gilmour A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *Int J Food Microbiol.* 2004;91:167-174.
- Lukinmaa S, Miettinen M, Nakari UM, Korkeala H, Siitonen A. *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections: Variation of sero and genotypes during an 11 year period in Finland. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1694-1700.
- Lundén J, Tolvanen R, Korkeala H. Human listeriosis outbreaks linked to dairy products in Europe. *J Dairy Sci.* 2004; E. Suppl:E6-E11.
- Ortiz De Urbina E, Tapia De Daza M, Miranda LD. Incidencia de *Listeria monocytogenes* en productos lácteos de alto consumo en la región de Cojedes, Venezuela. *Rev UNELLEZ Ciencia Technol.* 1993;11:41-49.
- Vázquez-Boland JA, Kuhn M, Berche P, Chakraborty T, Domínguez-Bernal G, Goebel W, et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:584-640.
- Lovett J. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *J Assoc Off Anal Chem.* 1988;71:658-660.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Queso amarillo. 2da. Revisión. 1538-92. Caracas, Venezuela. 1992.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Aislamiento e Identificación de *Listeria monocytogenes* en alimentos. 3713-01. Caracas, Venezuela. 2001.
- Hitchins AD. *Listeria monocytogenes*. In: *Bacteriological Analytical Manual*. Food and Drug Administration (FDA)/AOAC International. 8th ed. USA: Arlington, Capitulo 10 y 11. 1995. p. 10-01-10-08.
- Sorrells KM, Enigl DC. Effect of pH, acidulant, sodium chloride and temperature on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J Food Saf.* 1990;11:31-37.
- De Curtis ML, Franceschi O, De Castro N. *Listeria monocytogenes* en vegetales mínimamente procesados. *ALAN.* 2002;52:282-288.
- Seeliger HPR, José D. Genus *Listeria* Pirie 1940. In: *Sneath PHA, Mair NS, Sharper ME, Holt JG. eds. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 2.* Baltimore: Williams & Wilkins Co.; 1986. p. 1235-1245.
- Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). Leche y sus derivados. Determinación de la acidez titulable. 658-87. Caracas, Venezuela. 1997.
- Schöbitz RM, Horzella M, Carrasco E. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro Sur.* 2001;29:114-119.
- Donnelly C, Briggs E. Psychotropic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J Food Prot.* 1986;49:994-998.
- Cinti R, Scaramelli A, González I. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en muestras de queso blanco duro tipo llanero del distrito sanitario uno del estado Aragua, Venezuela. *Rev FCV.* 1999;40:101-110.
- Villalobos LB, Martínez RE. Aislamiento e Identificación por métodos convencionales y PCR de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos frescos comercializados en Cumaná, Venezuela. *RC.* 2007;17: 529-536.
- Carrillo L, Zambrano M. Detección de *Listeria* spp. en quesos blancos semiduros comercializados en San Cristóbal, Estado Táchira. *Rev Cient UNET.* 2006;18:8-15.
- Baquero DM, Bernal A. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos artesanales expedidos en la plaza de mercado de Cáqueza. *NOVA.* 2006;5:80-83.
- Albarracín FY, Sarmiento P, Carrascal AK, Mercado M. Estimación de la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en quesos frescos (queso de hoja, cuajada) y queso doble crema producidos y comercializados en el Municipio Pamplona, Norte de Santander. *BISTUA.* 2006;4:30-41.
- Gallegos J, Arrieta G, Máttar S, Poutou R, Trespalacios A. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeros. *Rev MVZ Córdoba.* 2007;12:996-1012.
- Martino TK, Leyva V, Pérez A, De Los Reyes M, Suárez F, Lara C. Determinación de *Listeria* spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Rev Cuba Salud Pública.* 2005;31:217-222.
- Pintado C, Oliveira A, Pampulha ME, Ferreira M. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiol.* 2005;22:79-85.
- Rudol M, Scherer S. High incidence of *Listeria monocytogenes* in European red smear cheese. *Int J Food Microbiol.* 2001;63:91-98.
- Arias ML, Monge R, Antillón F, Glenn E. Occurrence of the bacteria *Listeria* spp. in raw milk in Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 1994;42:711-713.
- Oreamuno S. Presencia de *Listeria monocytogenes* y su nivel de coliformes fecales durante la manufactura de queso blanco en plantas de la zona de Santa Cruz, Turrialba (Tesis de Grado). San José: Universidad de Costa Rica; 1994. 80.
- Gaya P, Sanchez J, Medina M, Nuñez M. Incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in raw milk produced in Spain. *Food Microbiol.* 1998;15:551-555.
- Bottarelli A, Bonardi S, Bentley S. Presence of *Listeria* spp. in short-ripened cheeses. *Ann Fac Medic Vet di Parma.* 1999;19:181-188.
- El Marrakchi A, Hamama A, El Othmani F. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products produced or imported into Morocco. *J Food Prot.* 1993;56:256-259.
- Pitt W, Harden T, Hull R. *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. *Australian J Dairy Technol.* 1999;54:49-65.
- Reuben A, Treminio H, Arias L, Chaves C. Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica. *Arch Latinoam Nutr.* 2003;53:389-392.
- Morales L, De La O A, Vázquez-Sandoval M, Barbosa R. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Guadalajara, México. *J Food Prot.* 1995;58:1139-1141.
- Espinoza A, De La Torre M, Salinas FM, Sánchez V. Determinación de *Listeria monocytogenes* en queso fresco de producción artesanal que se expende en los mercados del Distrito de ICA, Enero-Marzo 2003. *Rev Perú Med Exp Salud Publica.* 2004;21:71-75.
- Villanueva E. *Listeria monocytogenes* en quesos frescos en 5 mercados de expendio en Lima (Tesis de Grado). Lima: Universidad Nacional

- Mayor de San Marcos; pp75;2000.
36. Torres KJ, Sierra SC, Poutou RA, Vera H, Carrascal AK, Mercado M. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la Industria de Alimentos. Rev UDCA. 2004;7: 27-57.
 37. Benadof D. *Listeria monocytogenes*. Rev Chile Infectol. 2008;25:350-350.
 38. Valladares A, Mendoza S. Investigación e incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos Venezolanos (Tesis de Maestría). Caracas: Universidad Simon Bolívar, Venezuela; pp 58;1992.
 39. Garzaroli C, Rondinini G. Study on quantitative determination of *Listeria* spp. in dairy products. Food Sci Technol. 1992;25:158-161.
 40. Mayorga MA. Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda de tanques de frío en lecherías y tanques comunitarios provenientes de 9 sectores de la provincia de Cautín, IX Región (Tesis de Grado). Temuco: Universidad Católica de Temuco, Chile; pp 34;2004.
 41. Felon DR. *Listeria monocytogenes* in the natural environment. In: Ryser, ET, Marth EH, eds. *Listeria*, Listeriosis, and Food Safety. 2nd Ed. Aberdeen: CRC Press; 1999. 21-38.
 42. Rossi ML, Paiva A, Tornese M, Chianelli S, Troncoso A. Brotes de infección por *Listeria monocytogenes*: Una revisión de las vías que llevan a su aparición. Rev Chil Infect. 2008;25:328-335.
 43. Arias-Echandi M, Antillón F. Contaminación microbiológica de los alimentos en Costa Rica. Una revisión de 10 años. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. San José. Costa Rica. Rev Biomed. 2000;11:113-122.
 44. Doyle MP, Glass KA, Beery JT, García GA, Pollard DJ, Schultz RD. Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. Appl Environ Microbiol. 1987;53:1433-1438.
 45. Frank JF, Koffi RA. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. J Food Prot. 1990;53: 550-554.
 46. Farber JM, Coater F, Daley E. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol. 1992;15:103-105.
 47. Flanders KJ, Donnelly CW. Injury, resuscitation and detection of *Listeria* spp. from frozen environments. Food Microbiol. 1994;11:473-480.
 48. Ryser ET. Public Health Concerns. In: Marth E, Steele J, eds. Applied Dairy Microbiology. New York: Marcel Dekker, Inc; 1998. 263-404.
 49. Cole MB, Jones MV, Holyoak C. The effect of pH, Salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. J Appl Bacteriol. 1990;69:63-72.
 50. Gahan CG, O'Driscoll B, Hill C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. Food Technol. 1996;62:3128-3132.
 51. Conner DF, Brackett RE, Beuchat LR. Effect of temperature, NaCl and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. Appl Environ Microbiol. 1986;52:59-63.
 52. Juneja VK, Foglia TA, Marmer BS. Heat resistance and fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*: effect of pH, acidulant, and growth temperature. J Food Prot. 1998; 61:683-687.
 53. Blom H, Nerbrink E, Dainty R, Hagtvedt T, Boch E, Nissen H, et al. Addition of 2.5% lactate and 0.25% acetate controls growth of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed, sensory-acceptable serve at sausage and cooked ham stored at 4°C. Internat J Food Microbiol. 1997;38:71-76.
 54. Gnanou N, Audinet N, Kérouanton A, Colin P, Kalmokoff M. Evolution of *Listeria* populations in food samples undergoing enrichment culturing. Int J Food Microbiol. 2005;104:123-134.
 55. Iriarte J, Villanueva MR. Método rápido de detección e identificación de *Listeria monocytogenes* en carne y productos cárnicos. Alimentación Equipos Tecnol. 1993;12:65-72.
 56. Nolan DA, Chamblin DC, Troller JA. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. Int J Food Microbiol. 1992;16:323-335.
 57. Saltijeral JA, Alvarez VB, Garcia B. Presence of *Listeria* in Mexican cheeses. J Food Safety. 1999;19:241-247.