

“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 de Pamplona, Norte de Santander”

Albarracín F. Y.¹, Sarmiento P.¹, Carrascal A. K.², Mercado M²

¹Instituto de Ciencias Naturales y Biotecnología, Grupo de Investigación en Recursos Naturales, Universidad de Pamplona. Email: yoli@unipamplona.edu.co

²Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Grupo de Investigación en Biotecnología y Microbiología Ambiental e Industrial, Pontificia Universidad Javeriana.

Recibido 25 Agosto de 2006

Aceptado 27 Octubre 2006

ABSTRACT

The objective of this paper was to estimate the proportion of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp.* in fresh cheese and those of double creamy cheeses that are produced and sold in the Municipality of Pamplona, Northern Santander. This was done through the application of polls and stratified sampling established by the total number of samples as well as the number of sales' points of majority of commerce in the selling these products. The technique utilized for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* was described by INVIMA in 1998 and for the isolation and identification of *Salmonella spp.* the traditional technique of the presence or the absence of this was used.

With relation to those pathogens analyzed 31/185 (16.8%) were achieved in the isolation of the corresponding strains of the genus *Listeria* distributed in the following way: 11 (35.5%) of *Listeria monocytogenes* and 20 (64.5%) of other species. In the case of *Salmonella spp.*, even though no evidence of this was found in the products mentioned and analyzed, this does not mean that they are absent in them but that factors like the pH acid in the cheeses, the low amount of sugars for their development and low oxygen quantity in these cheeses could mask the presence of this microorganism.

This work allowed the establishment of the incidence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella spp* in fresh cheese sold here. Additionally, this also allowed an inventory to be made of the places where cheeses are sold plus the determination of the variables, the volume of sales, the type of wrapping, forms of storage, sanitary registry and the production enterprise of the cheeses. Besides this data, the presence was seen of *Listeria monocytogenes* and other types of this species in the three kinds of cheeses studied.

KEY WORDS

Fresh Cheese, Double Creamy Cheese, Solid Cottage Cheese, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estimar la proporción de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* en quesos frescos y quesos doble crema que se producen y comercializan en el municipio de Pamplona. Mediante la aplicación de encuestas y el muestreo estratificado, se establecieron tanto el número total de muestras como el número de expendios de mayor comercialización de dichos productos. La técnica utilizada para el aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* fue la descrita por INVIMA en 1998 y para el aislamiento e identificación de *Salmonella spp* la técnica tradicional de presencia/ausencia

Con relación a los patógenos analizados, se lograron aislar 31/185 (16.8%) cepas correspondientes al género *Listeria* distribuidas así: 11 (35.5%) de *Listeria monocytogenes* y 20 (64.5%) de otras especies. Para el caso de *Salmonella spp*, aunque no se encontró evidencia de ella en los productos analizados, no significa su ausencia en ellos, sino que factores como el pH ácido de los quesos, la baja disponibilidad de azúcares para su desarrollo y tensiones de oxígeno bajas en el queso pueden enmascarar la presencia de este microorganismo.

Este trabajo permitió establecer por primera vez la incidencia de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella spp* en quesos frescos comercializados en Pamplona. Adicionalmente permitió realizar un inventario de los lugares que comercializan quesos así como la determinación de las variables volumen de venta, tipo de empaque, forma de almacenamiento, registro sanitario y empresa productora del queso. Igualmente, se evidenció la presencia de *Listeria monocytogenes* y otras especies de este género en los tres tipos de quesos estudiados.

PALABRAS CLAVES

Quesos fresco, queso doblecrema, cuajada, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*

INTRODUCCION

La provincia de Pamplona, es una de las mayores productoras de productos alimenticios, siendo el área de lácteos una de las más posicionadas, específicamente la producción de quesos. Los quesos que más se comercializan incluyen cuajada, queso campesino, queso de hoja y queso doblecrema. A pesar de la alta producción de estos productos en la región, las plantas de lácteos y microempresas no han sido sometidas a inspecciones y seguimientos con la frecuencia y periodicidad que el programa de alimentos establece, no obstante, se presume que cumplen con las normas establecidas en los decretos expedidos por el Ministerio de Protección Social, para regular el procesamiento de leches y derivados lácteos como lo son los Decretos 616 de febrero 28 de 2006 y el 02310 del 24 de febrero de 1986,

modificado por la resolución 01804 de 1989 que rige la elaboración y procesamiento de quesos.

Los quesos frescos elaborados a partir de leche que no son sometidos a tratamientos rigurosos como la pasteurización antes de ser consumidos, se constituyen en una fuente potencial de transmisión de patógenos, causantes de enfermedades como Salmonelosis, Listeriosis, enfermedades entéricas y en general enfermedades caracterizadas por fiebre, diarrea y vómito (ANDERSON, 2000). *Salmonella spp* es una de las bacterias de mayor importancia en quesos, ya que llega a estos alimentos por contaminación a partir de las manos del ordeñador, por heces de los animales, por contaminación del equipo de ordeño, por aguas contaminadas o por una deficiente cocción en la materia prima

(leche)(MUÑOZ, 1996). De otro lado, estudios realizados por (MUÑOZ, 1999) han demostrado la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos siendo este un microorganismo emergente que ha cobrado especial importancia en los últimos años debido a su tasa de mortalidad (alrededor del 30%). Teniendo en cuenta los antecedentes anteriores y conocedores de la ausencia de datos epidemiológicos en la región de Pamplona, este trabajó logró establecer que la presencia de estos microorganismos constituye un factor de riesgo asociado al consumo de quesos en la Provincia de Pamplona.

MATERIALES Y METODOS

Muestreo

Los datos se recolectaron mediante la aplicación de una encuesta precodificada que permitió identificar los establecimientos con mayor comercialización de quesos frescos y doble crema. Se aplicó un total de 45 encuestas y mediante un muestreo estratificado, se estableció el número total de muestras que debía tomarse en cada expendio así como el número de expendios donde tomar las muestras. Así, el número total de muestras de quesos fue de 185. Las muestras se tomaron en condiciones asépticas y fueron transportadas en refrigeración hasta el Laboratorio de Control de Calidad y Diagnóstico de la Universidad de Pamplona.

Análisis de las muestras

Para la investigación de *Listeria monocytogenes* se utilizó la técnica de presencia/ausencia descrita por el INVIMA en 1998 con la modificación en la utilización del Caldo de Enriquecimiento Palcam por el Caldo LEB. Inicialmente se realizó un enriquecimiento homogeneizando 25 grs de cada muestra con 225 ml de Caldo Selectivo Palcam adicionado con 90 µl de polimixina, 11.25 µl de fosfomicina y 22.5 µl de ceftacidina incubando a 30 ± 2 °C por 18 - 24 horas. Pasado el tiempo de incubación, se tomó una asada de los Caldos de Enriquecimiento que presentaron ennegrecimiento por la hidrólisis de la esculina que contiene el medio, y se sembró por

agotamiento en medios selectivos para *Listeria* Palcam y Oxford (SCHARLAU) incubando a 30 ± 2 °C por 24 - 48 horas. Una vez obtenidas colonias presuntivas que crecieron en los medios selectivos, se confirmaron mediante aislamiento en agar TSAYE (agar tripticasa de soya extracto de levadura, SCHARLAU), el cual se incubó a 37 °C durante 18 - 24 horas. En este medio se realizó la prueba de Iluminación de Henry y aquellas colonias que resultaron positivas se les realizó prueba de catalasa en portaobjetos utilizando peróxido de hidrógeno al 3% y tinción de gram para observar bacilos Gram positivos. Estas pruebas permitieron la identificación de género y posteriormente las cepas que correspondieron al género *Listeria* fueron transportadas al laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana para la confirmación de especie mediante la técnica de PCR descrita por (BANSAL, 1996; BURBANO, 2003; SIERRA, 2004) la cual amplifica un fragmento de 936 pb correspondiente a la subunidad 16sRNA y otro fragmento de 750 pb que amplifica el gen hylA (*listeriolisina O*). Para la investigación de *Salmonella spp.*, se realizó preenriquecimiento, enriquecimiento y crecimiento en medios selectivos y confirmación bioquímica y para la identificación de especie se usó el kit API20E (Biomérieux). Todas las cepas identificadas como *L. monocytogenes* se almacenaron a -70°C con glicerol al 10%, con el fin de conformar un banco de células primarias (AMADOR, 1994) (BURBANO, 2003). Como control interno de la técnica, se usó una cepa de *L. monocytogenes* (ATCC 19115) y *Salmonella enteritidis* ATCC13076.

Para el análisis de los datos obtenidos en las encuestas se trabajó con el programa EPI-INFO6. Primero se realizó un análisis descriptivo de las variables tiempo de almacenamiento, registro sanitario, tipo de queso, lugar de venta, posteriormente se realizó un análisis divariado. Se cruzaron diversas variables, para establecer su relación con la presencia de *L. monocytogenes*.

Adicionalmente se estimó la incidencia de *L.*

monocytogenes y *Salmonella spp* del municipio de Pamplona, mediante la siguiente fórmula: (GREENBERG ET AL, 2005)

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Número de cepas de Listeria monocytogenes en quesos}}{\text{Total de muestras de leches analizadas}} \times 100$$

Total de muestras de leches analizadas
(1)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la toma de muestras se seleccionaron los puntos de venta con mayor expendio de los quesos en estudio, se descartaron aquellos expendios que no vendían queso de hoja, queso doble crema o cuajada. En total se analizaron 185 muestras de queso distribuidas de la siguiente manera.

Tabla 1. Número de muestras analizadas por tipo de queso

Tipo de queso	n	%
Queso doble crema	74	40
Queso de hoja	83	44.8
Cuajada	28	15.1

Se analizaron un total de 185 muestras de queso proveniente de 20 establecimientos ubicados en el municipio de Pamplona. El mayor número de muestras se tomó en la Lonchería Italia y Tienda Mixta San Pedro, cada una con 32 muestras; estos datos se tomaron basados en el volumen de queso que comercializan. Los establecimientos donde se tomaron las muestras presentaron la siguiente distribución. (Tabla 2)

Tabla 2. Distribución de tipos de expendios que comercializan queso en Pamplona

Tipo de establecimiento	n	%
Tienda	161	87
Supermercado	3	1.6
Plaza de mercado	20	10.8
Venta comida rápida	1	0.5
Total	185	100

Se observó que el 82.7% (153/185) de los quesos estudiados no cuentan con registro sanitario, solo el 16,2% (30/185) cuenta con

registro, se encontró un 1.1% donde el producto tenía una etiqueta que estipulaba "licencia en trámite". Al analizar los empaques que se utilizan para los quesos se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 3. Empaques utilizados en los quesos

Tipo de empaque	n	%
Bolsa de polietileno	125	67.6
Recipiente plástico	15	8.1
Sin empaque	33	17.8
No informa	12	6.5

De otro lado, al analizar los sistemas de almacenamiento de los quesos en los sitios de expendio observamos que se almacena en vitrina el 4.3%(8/185), el 69.2% (128/185) en tanques de refrigeración, el 6.5% (12/185) se almacena en neveras y un 20% (37/185) a temperatura ambiente, encontrándose una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.001$). Con relación a los patógenos analizados, no se encontró evidencia de *Salmonella spp* en los quesos analizados (0/185); para el caso de *Listeria*, se lograron aislar 31/185 (16.8%) cepas correspondientes a este género distribuidas de la siguiente manera: 11 (35.5%) de *Listeria monocytogenes* y 20 (64.5%) de otras especies.

En la Figura 1 se observan algunas de las cepas caracterizadas por PCR.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11



Figura 1. PCR para *L. monocytogenes* a partir de muestras de queso. Pozo 1. Blanco, Pozo 2. *L. monocytogenes* ATCC19115, Pozos: 3,4 y 7 blancos. Pozo 5. *Listeria sp* (Queso doble crema). Pozo 6. *L. monocytogenes* (cuajada). Pozo 8. Patrón de Peso molecular 1kb leader. Pozo 9,10 y 11. *Listeria sp.* (queso doble crema)

Análisis divariado

Al analizar el tipo de establecimiento que presentan registro sanitario, se encontró una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$), ya que solamente 2 establecimientos de los encuestados venden quesos con registros sanitarios. Así mismo, al analizar el tipo de empaque con el establecimiento, se observó una diferencia significativa ($p < 0.001$), siendo los locales "Tienda San Antonio" y "Rincón de La Mejor, los que expenden el queso sin empaque.

Al evaluar la presencia de *Listeria sp* en los tipos de queso, se observó que la distribución fue mayor en queso doble crema y no se encontró en queso campesino; no se encontró evidencia estadísticamente significativa ($p=0.13$)

Tabla 4. Presencia de *Listeria spp* en quesos.

Tipo de queso	Ausencia	Presencia
Queso campesino	3	0
Queso doble crema	64	18
Queso de hoja	61	12
Cuajada	26	1
Total	154	31

Igualmente al evaluar la presencia de *Listeria spp* y *L. monocytogenes* con relación al tipo de establecimiento, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.649$) ($p=0.40$) respectivamente. En cuanto a la distribución de *Listeria spp* por tipo de almacenamiento, se observó una mayor proporción en tanques de refrigeración (28/31) con respecto a los otros sistemas, encontrándose evidencia estadísticamente significativa entre los tipos de almacenamiento ($p=0.0391$). Al analizar la presencia de *Listeria*

spp con relación al tipo de empaque utilizado, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p= 0.23$). De igual manera, al analizar si poseer o no registro sanitario tenía relación con la presencia de *Listeria spp* en los quesos, se encontró que no existía evidencia estadísticamente significativa ($p=0.48$).

En el caso de *L. monocytogenes*, no se encontró evidencia estadísticamente significativa ($p= 0.288$) con relación al tipo de queso; la distribución fue la siguiente: queso doble crema (5), queso de hoja (5) y cuajada (1). No se encontró evidencia estadísticamente significativa entre la presencia de *Listeria spp.* vs *L. monocytogenes* ($p= 1.0$) en los diferentes tipos de quesos estudiados. Al cruzar los datos del tipo de establecimiento y la presencia de *Listeria spp*, se encontró diferencia significativa con un $p= 0.044$ del total de establecimientos (20). De ellos, 9 presentaron *Listeria spp.*, siendo la "Tienda Mixta San Pedro", el expendio con mayor número de muestras de *Listeria spp.* 10/31 (32.35%).

Análisis multivariado:

Al realizar el análisis multivariado se encontró diferencia altamente significativa cuando se relacionó el tipo de establecimiento, la presencia de registro sanitario y la ausencia de *L. monocytogenes* con un $p < 0.01$. No se observó evidencia significativa cuando se cruzaron el tipo de empaque, el almacenamiento y la presencia de *Listeria* en los quesos. Igualmente, no se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar el tipo de establecimiento, la presencia de registro y la ausencia de *Listeria spp.* ($p= 0.11$) Tabla 5.

Tabla 5. Análisis multivariado.

Tipo de negocio	Sin registro	Con registro	No informa	Total
Tienda	109	21	2	132
Supermercado	1	2	0	3
Depósito	18	0	0	18
Comida rápidas	1	0	0	1
Total	129	23	2	154

· Municipio = Pamplona. El número en cada columna hace referencia a la ausencia de *Listeria spp*.

De otro lado, al hacer la relación entre el tipo de almacenamiento, el tipo de establecimiento y la ausencia de *Listeria spp*, se encontró una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) donde en las muestras tomadas en los supermercados y en los puntos de venta de comidas rápidas no se evidenció la presencia de *Listeria spp*, y en las muestras tomadas en las tiendas se observó el mayor número de cepas de *Listeria* asociado a tanques de refrigeración.

Resultados de las pruebas estadísticas:

Es importante señalar que en este estudio se encontró una diferencia estadísticamente alta entre los comercializadores de queso y la presencia de *Listeria spp*, ya que al realizar una inspección de los puntos de venta, se observó que aquellos donde hubo presencia de *Listeria* las condiciones higiénicas son inadecuadas y es posible que la presencia de este microorganismo este asociado al manejo del queso por parte del comercializador, y que este microorganismo este formando biopelículas dentro de los establecimientos, lo que favorece la proliferación de este.

Adicionalmente, se logró establecer que la presencia de *Listeria monocytogenes* esta asociada al tipo de almacenamiento, encontrándose mayor número de *Listeria* en "tanques de refrigeración". Estos tanques comúnmente son llamados "botellers" y se utilizan para refrigerar botellas de refrescos y bebidas alcohólicas y normalmente el material interno de construcción no es el empleado para la neveras industriales. En ellos se forman depósitos de agua que permiten la proliferación de microorganismos y manejan una humedad relativa alta apta para el desarrollo de *Listeria spp*.

Al realizar las encuestas se observaron hallazgos que normalmente no se logran en este tipo de estudios por falta de evidencia documentada, por lo tanto, se hace una relación de los hallazgos más importantes que se encontraron en este estudio.

En la mayoría de los establecimientos analizados, estos productos no se encuentran almacenados en refrigeración, rompiendo de esta manera la cadena de frío. Adicionalmente, se encuentran expuestos a contaminación cruzada con otros productos crudos como frutas, verduras y carnes. Parte de este queso es vendido al detal, por lo que se cuenta con un cuchillo que en muchos casos se utiliza para varias actividades (cortar quesos, cuajadas, embutidos), generando contaminación cruzada. De otro lado, este queso se almacena en recipientes plásticos que no tienen protección en la parte superior, por lo que es frecuente la presencia de plagas alrededor de estos (en especial moscas). Estos quesos permanecen durante su comercialización a temperatura ambiente y en ningún momento son almacenados en refrigeración, lo que genera condiciones propicias para el desarrollo de microorganismos (Figura 2)



Figura 2. Expendio de quesos (se observa en la parte inferior la venta de pollo).

Se observó que los quesos que se comercializan en los supermercados difieren notablemente de los quesos que se expenden en tiendas y en la plaza de mercado, ya que muchos de estos son de marcas reconocidas a nivel nacional y cuentan con un registro sanitario y empaque adecuado.

En las tiendas los quesos que más se comercializan son el queso de hoja y la cuajada, la presentación del queso de hoja

difiere dependiendo del proveedor, pero en general es redondo y su empaque se hace en bolsa plástica o en hojas de vijao; en algunos sitios se apilan los quesos y lo que los separa es una hoja de vijao. Es importante señalar, que la hoja de vijao no es considerada un empaque adecuado, ya que se convierte en un foco de contaminación debido a que este empaque no es inerte y pueden migrar sustancias provenientes de la hoja, así como microorganismos. Así mismo, estos quesos no tienen rotulo que indique la fecha de vencimiento, siendo esta responsabilidad directa del productor. Al no existir una fecha de vencimiento de los quesos estos pueden ser vendidos a los consumidores después de haber cumplido su vida útil (la cual varía de 21-30 días) (Resolución 01804 de 1989, del Ministerio de Salud).

Como lo menciona el decreto 3075/97 del Ministerio de Salud, en el título 1, artículo 3, los quesos frescos son considerados como productos de alto riesgo, debido a que poseen un Aw alto, pH cercanos a la neutralidad y nutrientes suficientes para la proliferación microbiana (Min. Salud, 1997). Vargas y Zúñiga en el 2001, realizaron un estudio sobre la calidad microbiológica de los quesos frescos procesados y comercializados en el municipio de Ubaté, donde establecieron que los productores de quesos no pasteurizan la leche, los quesos doble crema presentaron recuentos altos de hongos y levaduras, así como de coliformes fecales, además encontraron que los quesos en esta región se hacen con poca tecnificación (VARGAS et al, 2001). Teniendo en cuenta lo anterior, para garantizar la calidad higiénica e inocuidad del queso, la leche con la que este se fabrica, debe ser pasteurizada, garantizando en las primeras etapas la ausencia de microorganismos patógenos; Vitas y Col han señalado que una temperatura de 65 °C puede considerarse como Listericida (VITAS et al 2004)

Es importante resaltar, que el número de quesos que no cuentan con registro sanitario es alto 82.7%, y que el no poseer registro

sanitario va en contravía de la legislación ya que este tipo de producto debe tener este registro. Existen diversas razones para no poseer dicho registro debido a que muchos de estos quesos (especialmente cuajada y queso de hoja) son elaborados por pequeños productores que no tienen los ingresos suficientes para poder pagar un registro sanitario, adicionalmente, el desconocimiento de la legislación por parte de los productores hace que estos no busquen obtener el registro sanitario así como, la falta de un censo por parte de la oficina de saneamiento básico que realice un seguimiento de los productores y la falta de exigencia de los comercializadores de este registro. Como se mencionó anteriormente, se encontró un porcentaje de quesos que tenían en su etiqueta la leyenda "licencia en trámite", esta etiqueta no es compatible con la legislación actual ya que los alimentos procesados deben poseer un registro sanitario que es válido para todo el territorio nacional (MIN SALUD, 1997).

De otro lado, vale la pena señalar que durante la investigación los quesos almacenados empezaron a presentar un olor a putrefacción compatible con la presencia de *Clostridium*, por lo que se procedió a realizar el recuento de este grupo indicador encontrando poblaciones de 16×10^3 UFC/g. Si bien este grupo no era objeto de este estudio, es posible que sea un competidor de los patógenos que se estudiaron en esta investigación, mas si se tiene en cuenta que los remanentes de lactosa que quedan en el queso pueden ser utilizados por este grupo de microorganismos, mientras que los géneros *Listeria sp* y *Salmonella spp* no utilizan este azúcar. Ahora bien, de los tres grupos microbianos, está demostrado que *Salmonella spp* puede sobrevivir en los quesos hasta 2 meses gracias a que es capaz de protegerse en los glóbulos de grasa, permitiéndole de esta manera ser resistente al pH del estómago y colonizar el intestino (LEYER ET AL, 1992). Como se mencionó en este estudio, no se logró la recuperación de *Salmonella spp* por lo que es posible que uno de los factores que haya impedido su

recuperación sea el pH de los quesos estudiados, los cuales estuvieron entre 5,24 y 5,88. Leyer ha señalado que *S. enteritidis* puede desarrollarse a pH de hasta 5.8, mientras que a pH de 4.0 se mantiene viable pero no puede reproducirse. Estudios realizados por Waterman y Small (1998) han demostrado que *Salmonella* spp puede crecer en la superficie de alimentos con pH de hasta 3.27, señalando que el microambiente alrededor del microorganismo es muy importante para tolerar esta condición. También es importante señalar, que en estos estudios parte de la tolerancia está asociado al uso de alimentos con alto contenido de grasa y bajo contenido de proteína pero en este caso no pueden correlacionarse ya que los quesos son alimentos con alto contenido de proteínas. (WATERMAN ET AL, 1998).

La ausencia de *Salmonella* spp en el queso puede atribuirse también al posible efecto inhibitorio de ácidos grasos propios de la leche, pues ensayos "in vitro" para estudiar la viabilidad del patógeno han demostrado que los ácidos acético, butírico y propiónico a pH 5.8 son fuertemente bactericidas, provocando la ruptura de la membrana celular (estos ácidos probablemente provienen de la fermentación láctica generada en estos quesos). La acción tóxica de los ácidos grasos insaturados se asocia a la formación de radicales libres; en contraste, los ácidos grasos saturados pueden provocar lisis bacteriana por cambios en la fluidez de la membrana lipídica (KWON ET AL, 1998).

Es posible que la no detección de *Salmonella* spp en estas muestras no signifique la ausencia de esta, sino por el contrario que factores como el pH ácido, baja disponibilidad de azúcares para su desarrollo y competencia con otros microorganismos que posean una tasa de duplicación mayor, así como tensiones de oxígeno bajas en el queso puede enmascarar la presencia de este microorganismo.

En este trabajo como se mencionó anteriormente, se lograron aislar 31 cepas

pertenecientes al género *Listeria* sp. En Colombia, se han realizado diversos estudios siendo Bogotá la región que presenta el mayor número de datos con relación a este microorganismo en quesos. El primer reporte que se tiene en Colombia sobre la incidencia de este microorganismo fue en 1994, donde se lograron examinar 120 muestras de quesos frescos y 35 de quesos madurados, detectándose *L. monocytogenes* en el 26.6% de quesos frescos y en el 22.8% de quesos madurados (MUÑOZ ET AL, 1996).

Muñoz y Pérez 1997, encontraron una ocurrencia de *Listeria* sp del 43% y de *L. monocytogenes* de 12%, en el estudio realizado por Vanegas y Col en el 2003, se encontró un porcentaje de 29.2 de *L. monocytogenes* aislados de queso campesino en Bogotá. En Antioquia, al realizar el estudio en quesos frescos se encontró una incidencia de *L. monocytogenes* del 33.1% (MOSOS, 1997).. Con relación a estudios obtenidos en otras regiones del país, llama la atención el trabajo realizado por (GALLEGOS ET AL, 2006), quien procesó 217 muestras de queso costeño en el Departamento de Córdoba y no logró recuperar cepas de *L. monocytogenes*, sin embargo logró recuperar 22.58% de las muestras con otras especies de *Listeria*, siendo la más importante *L. ivanovii*. Estos resultados podrían estar asociados a condiciones de alojamiento, tipo de ensilaje e higiene de la leche. (GAYA, 1996),

Son diversos los factores que favorecen el desarrollo de este microorganismo en estos productos dentro de las que se incluyen: el origen de la leche, los utensilios utilizados durante la elaboración de este, la presencia de biopelículas dentro de la planta procesadora de alimentos, condiciones de microaerofilia en los quesos, entre otros. Es importante señalar que los quesos frescos han sido asociados en el mundo entero como el primer alimento implicado en brotes de listeriosis; los quesos que se han visto implicados en brotes incluyen: queso tipo mexicano, brie, cheddar y feta (MARTH ET AL, 1999).

Debido a la implicación de lácteos en brotes de listeriosis donde se han presentado casos de muerte, diversos estudios han evaluado el riesgo de la leche cruda en función de su destino final, así el riesgo es mínimo luego de un tratamiento térmico pero en su ausencia la leche puede resultar peligrosa (VITAS ET AL. 2004), como es el caso de la elaboración de quesos artesanales, los cuales hicieron parte de este estudio donde no se realiza pasteurización de la materia prima.

De otro lado es importante señalar que en los quesos doble crema (los cuales entran en la clasificación de quesos hilados y fermentados) se encontró la presencia de *L. monocytogenes*, pudiéndose explicar por contaminación post proceso, probablemente durante el empaque, lo que indicaría la presencia de este patógeno en las fábricas procesadoras de este tipo de queso.

Con relación a la técnica utilizada para el aislamiento de *L. monocytogenes* es posible que los resultados obtenidos estén subvalorados ya que existen diversos factores que pueden haber influido en la recuperación del microorganismo, pues inhibidores utilizados como la acriflavina puede ligarse a proteínas del alimento reduciendo en 60% su concentración inicial. El tipo de proteína, (disponibilidad de grupos carboxilo), el pH y la estructura del alimento (fluido, cortado, triturado) determinan la cantidad de antibiótico que puede ser ligado. A pH menor a 5.8, mayor acriflavina ligada, lo que reduce la actividad de la misma, restringiendo el crecimiento de *L. monocytogenes* como consecuencia de que se ha favorecido el crecimiento de los microorganismos competidores, caso que se presentó en este estudio donde como se mencionó anteriormente, el pH de estos fue menor a 5.8 soportando esta hipótesis (BEUMER, R. ET.AL., 1996). Adicionalmente, competidores como *Enterococcus* y *Streptococcus* que pueden provenir de la leche, los cuales tienen una tasa de duplicación mayor; pueden enmascarar el resultado, ya que estos son capaces de desarrollarse en los

medios selectivos que se utilizan para la caracterización de *L. monocytogenes* (DUFFY, 1994).

Como se mencionó en este trabajo, se obtuvieron 20 cepas correspondientes a otras especies diferentes a *L. monocytogenes*. En el caso de este género microbiano se sabe que no son igualmente afectados por los inhibidores porque las cepas no patógenas al crecer más rápido enmascaran la presencia de los patógenos (BEUMER, 1996). Si bien no era parte de este estudio caracterizar las otras especies, se pudo establecer que 5/20 cepas correspondían a *L. innocua*. Con relación a este microorganismo se sabe que comparte el nicho ecológico con *L. monocytogenes*, y que *L. innocua* tiene ventaja competitiva por su velocidad específica de crecimiento (CURIALE ET AL, 1994). En la práctica, el sobrecrecimiento de una especie sobre otra se manifiesta como si en la muestra no existieran otras especies de *Listeria* (GNANOU-BESSE ET.AL. 2005), lo que genera un problema en el diagnóstico del patógeno, que llevaría a reportar falsos negativos con consecuencias nocivas para la salud pública (BEUMER ET AL, 2003).

Por último, vale la pena señalar que en este trabajo se pudo demostrar que el tipo de establecimiento y el tipo de almacenamiento tienen una relación directa con la presencia de *Listeria sp*, ya que en lugares donde el manejo de la humedad relativa dentro de las neveras es alta condicionan el crecimiento de este microorganismo, dato que no ha sido reportado en otros estudios, ya que la mayoría de estos se basan en estudiar aspectos mas puntuales como el pH y el tiempo de almacenamiento.

CONCLUSIONES

Se estableció que la incidencia de *L. monocytogenes* en quesos frescos y doble crema fue del 5.94% en el municipio de Pamplona. Sin embargo, en las mismas muestras analizadas, no se logró aislar cepas de *Salmonella spp* posiblemente por condiciones de pH, stress nutricional y ácidos

orgánicos presentes en los quesos estudiados. Igualmente, y aunque no era objetivo de este estudio, se observó la presencia de *Enterococcus* y *Clostridium* sulfito reductor en los quesos analizados en poblaciones altas, siendo competidores de los microorganismos objeto de estudio.

Con respecto a las demás variables que se tuvieron en cuenta, se encontró una diferencia altamente significativa ($p:0.001$) al analizar el tipo de establecimiento con el tipo de almacenamiento utilizado, predominando el almacenamiento en tanques de refrigeración. Se determinó que el 82.7% de los quesos comercializados no poseen registro sanitario y además, las condiciones higiénicas en las tiendas y plaza de mercado donde se comercializan los quesos presentan condiciones inadecuadas y contribuyen con los resultados microbiológicos obtenidos en este estudio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado conjuntamente por la Universidad de Pamplona y la Pontificia Universidad Javeriana con el apoyo de la Oficina de Saneamiento de la Empresa Social del estado Hospital San Juan de Dios del Municipio de Pamplona. Agradecemos al personal del Laboratorio de Control de Calidad y Diagnóstico de la Universidad de Pamplona y del Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Pontificia Universidad Javeriana por su invaluable asistencia logística. Así mismo agradecemos el apoyo de la Vicerrectoría de Investigaciones y del Instituto de Ciencias Naturales y Biotecnología de la Universidad de Pamplona como a la Facultad de Ciencias Básicas y el Departamento de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Bansal, N. (1996) Development of a Polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Applied Microbiology* 22: 353-356.
2. Beumer, R.R., Te Giffel, M.C., Anthonie, S.V.R., Cox, L.J. (1996) The Effect of Acriflavin and Nalidixic Acid on the Growth of *Listeria* spp. in Enrichment Media. *Journal of Dairy Science* 13: p.137-48.
3. Beumer, R.R., Hazeleger, V.C., (2003) *Listeria monocytogenes*: Diagnostic Problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35: p. 191-97.
4. Bottarelli A., Bonardi S., Bentley S. Presence of *Listeria* spp. in short-ripened cheeses. Istituto di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma - Lavoro effettuato con contributo en: <http://www.unipr.it/arpa/facvet/annali/1999/bottarelli1/bottarelli.htm> consultado 7/09/2006
5. Burbano, E.M., Carrascal, A.K., Mercado, M., Poutou, R.A. (2003) Validación de PCR para *Listeria monocytogenes* en Leches. *Normas y Calidad*, 57: 39-48.
6. Carrascal, A.K. (2003) Microorganismos emergentes una mirada nacional En: Taller de Inocuidad alimentaria. ILSI-Norandino. FAO. Quito, Ecuador
7. Curiale, M.S., Lewus, C. (1994) Detection of *Listeria monocytogenes* in Samples Containing *Listeria innocua*. *Journal of Food Protection*, 57: p.1048-1051

8. Desmesures, N and Gueguen, M (1997) Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over two years. *J. Dairy Res.* 64: 271-280.
9. Duffy, G., Sheridan, J.J., Buchanan, R.L., McDowell, D.A., Blair, I.S. (1994) The Effect of Aeration, Initial Inoculum and the Meat Microflora on the Growth Kinetics of *Listeria monocytogenes* in Selective Enrichment Broths. *Food Microbiology.* 11. 429-438
10. Espinoza M., De la torre, M y Salinas, M. (2004) Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito de Ica, enero - marzo 2003. *Rev. perú. med. exp. salud pública.* 21 (2) p.71-75.
11. Gaya, P., Saralegui, C., Medina, M., Nuñez, M. (1996) Occurrence of *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* spp in Raw Caprine Milk. *Journal of Dairy Science*, 79: 1936-1941
12. Gnanou-Besse, N., Audinet, N., Kérouanton, A., Colin, P., Kalmokoff, M. (2005) Evolution of *Listeria* Populations in Food Samples Undergoing Enrichment Culturing. *International Journal of Food Microbiology*, 104: p. 123-34.
13. Greenberg, R., Daniels, S., Flanders, D., Eley, J y Boring, J. *Epidemiología médica*. Cuarta edición. Editorial manual moderno, 2005. pp 21.
14. Holguín, M., Rubio, B. y Higuera, R. (1998) Manual de técnicas de análisis para control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano Colombia. Ministerio De Salud. Instituto Nacional De Vigilancia De Medicamentos Y Alimentos. Invima. División De Alimentos Y Bebidas Alcohólicas. Sección De Microbiología De Alimentos. Pp: 111
15. INVIMA. Enfermedades transmitidas por alimentos durante el año 2005. Febrero 28. En: www.invima.gov.co consultado el 7 de septiembre de 2006.
16. Kwon M and Ricke S. (1998) Induction of acid resistance of *Salmonella typhimurium* by exposure to short-chain fatty acids. *Appl. And Env. Microbiol.* 64 (9). 3458-3563.
17. Lafarge, V., Ogier, J., Girard, V., Madelen, V., Levau, J., Gruss, A and Buchet, A. (2004). Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. And Env. Microbiol.* 70 (9): 5644-5650
18. Leyer G and Jonson. (1992) Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp in cheese. *Appl. And Env. Microbiol.* 58 (6). 2075-2080.
19. Martino, T., Leyva, V., Pérez, A., De los reyes, M., Suárez, F y Lara O. (2005) Determinación de *Listeria* spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Rev. cub de Salud pública.* 31 (3). Revista on line: consultado 01/09/2006 .
http://www.bvs.sld.cu/revistas/spu/vol31_3_05/spusu305.htm
20. Marzocca, M.A., Marucci, P.L., Sica G.C, y Alvarez E.E. (2004) Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina) *Rev. Argent. Microbiol.* v.36 n.4
21. Ministerio de Salud (1989) Resolución 01804 por la cual se modifica la resolución 2310 de 1986 que reglamenta parcialmente el título V de la ley novena. Pg 9.
22. Ministerio de Salud Pública. Decreto 3075 de 23 de diciembre de 1997. Por el cual se

reglamenta parcialmente la ley 9 y se dictan otras disposiciones para la industria de alimentos. Pg. 35

23. Moreno, C. (2003) Brote de ETA en el Centro de Educación Distrital (CED) Santa Rita Sur Oriental. Boletín Informativo. Dirección de Salud Pública, 5(20): p. 25-27.
24. Mosos, R., Ocho, M y Estrada, S. (1997) importancia de los aislamientos de *Listeria monocytogenes* en quesos y quesitos elaborados en algunos municipios del Departamento de Antioquia. Boletín epidemiológico de Antioquia.
25. Muñoz, A. Díaz, G., (1996) Determinación e Identificación de *Listeria monocytogenes* en Quesos Frescos y Madurados que se Comercializan en Santafé de Bogotá NOTINVIMA (1): p. 18-21.
26. Muñoz, D., Pérez, M. (1998) Incidencia de *Listeria monocytogenes* en Quesos Frescos en Santa Fe de Bogotá. Tesis Pregrado. Directores, Pontificia Universidad Javeriana. 79 p.
27. O'Donnell, E.T. (1995). The incidence of *Salmonella* and *Listeria* in raw milk from farm bulk milk tanks in England and Wales. *Journal of the Society of Dairy Technology* 48, 25-29.
28. Schöbitz, R., Marín, M., Horzella M y Carrasco E (2001) Presencia de *Listeria monocytogenes* en leche cruda y quesos frescos artesanales. *Agro sur* v.29 n.2 Valdivia jul. 2001
29. Sierra, S., Poutou, R., Carrascal, A.K., Torres, K y Mercado, M (2004) Validación de PCR para detección de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos. *Actualidad y Divulgación Científica*. 7(2) pp.53-65
30. Sur, D., Ramamurphy, T., Deen, J and Battacharya, S. (2004) Shigellosis: challenges and management issues. *Indian J. Med Res* 120, 454-462.
31. Ryser, E.T., y Marth, E.H. (eds). (1999) *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*. Segunda edición, revisada y ampliada. Nueva York, Estados Unidos, Marcel Dekker. 738 págs.
32. Vanegas, M.C., Vergara, J.P., Rojas, I.J. (2003). Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en Quesos Distribuidos en Bogotá D.C in Memorias 1er Congreso Colombiano de Microbiología de Alimentos Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias: Bogotá, D.C. p. 104-105.
33. Van Hekken, D.L., Farkye, N.Y. (2003). Hispanic Cheeses: The Quest for Queso. *Food Technology*. 57(1) p. 32-38.
34. Vargas, E y Zúñiga, A. Evaluación microbiológica de los quesos frescos procesados y comercializados en el municipio de Ubaté. Tesis de grado mic industrial. Pp54.
35. Vitas, A.I., Aguado, V. Garcia-Jalon. (2004) Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Fresh and Processed Foods in Navarra (Spain) *International Journal of Food Microbiology*, 90: p. 349-356.