

Evaluación de *Listeria monocytogenes* y calidad microbiológica en quesos frescos de producción artesanal

*Paula Novak; Mariela Vera; Andrea Dallagnol; Amada Pucciarelli

Laboratorio de Microbiología de Alimentos y Biotecnología "Dr. Fernando Benassi"

Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales – UnaM. Posadas, Misiones, Argentina

*paunovak@hotmail.com



Resumen

Listeria monocytogenes es un patógeno emergente importante en las enfermedades transmitidas por alimentos, principalmente en productos lácteos como leche y quesos de pasta blanda. Esta bacteria puede crecer en intervalo de pH 4,1 hasta 9,6, siendo su pH óptimo de 7,2 a 7,6; es resistente a concentraciones elevadas de NaCl (30%); no es exigente nutricionalmente y es móvil a temperaturas entre 20°C y 25°C. Debido a la gravedad de su infección y su letalidad exige un estricto control higiénico de los productos susceptibles de ser contaminados. Los pequeños productores que comercializan en distintas ferias de la ciudad de Posadas y del interior de la provincia de Misiones elaboran los quesos criollos en forma artesanal, sin estandarización del proceso, incluyendo tiempo de coagulación, contenido de sal, humedad final y control de calidad microbiológica. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue determinar la incidencia de *Listeria* spp. y la calidad microbiológica en quesos criollos frescos recolectados en puestos de venta artesanal.

El muestreo fue realizado al azar incluyendo quesos de diferentes formas, tamaños y conservados a distintas temperaturas (ambiente y refrigeración). Se

aplicó el método tradicional para la detección cualitativa de *Listeria* spp. según la norma vigente del Código Alimentario Argentino (CAA) y de la Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual (FDA-BAM). Se analizaron 60 muestras, detectándose colonias presuntivas en 18 de ellas. A partir de estas muestras se recuperaron 160 aislamientos utilizando agar Oxford Modificado y Chromagar *Listeria* como medios selectivos.

Luego de las pruebas bioquímicas (movilidad, catalasa, tinción de Gram, fermentación de azúcares, etc.), el 17% de las cepas aisladas resultaron positivas para *Listeria innocua* y el 6% para *Listeria monocytogenes*. Los quesos presentaron una calidad higiénica sanitaria regular, con recuentos elevados de Bacterias Aerobias Mesófilas ($1,2 \times 10^4$ – 3×10^8 UFC/g), Mohos y Levaduras (10^2 a 7×10^8 UFC/g) y presencia de *Staphylococcus aureus* coag (+) (65%). También se observó contaminación fecal que superaba el límite permitido por el CAA de Coliformes Totales (30%) y Coliformes Fecales (12%), con presencia de *Escherichia coli* en el 10% de las muestras. No se detectó *Salmonella* spp (ausencia en 25g, CAA). Los resultados reflejan que estos productos presentan deficiencias en la manipulación, envasado y conservación. La presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos de consumo masivo como los quesos frescos artesanales en esta provincia, representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores.

Palabras clave: calidad microbiológica, quesos artesanales de Misiones, *Listeria monocytogenes*

Introducción

Listeria monocytogenes es un patógeno emergente importante en las enfermedades transmitidas a través de los alimentos y es muy frecuente encontrarlas en productos lácteos como leche y quesos de pasta blanda (Ministerio de Agricultura, 1999; Pellicer *et al.*, 2002). Su gravedad y alta letalidad exige un estricto control higiénico en los productos susceptibles de ser contaminados con este microorganismo (Axelson, 1998; Bell, 1998; Donnelly, 1992; Porto, 2001).

Es una bacteria aerobia y anaerobia facultativa, pero su proliferación mejora cuando los cultivos se incuban con reducción de dióxido de carbono del 5 al 10%. La temperatura mínima de desarrollo de este microorganismo psicrotrófico es 1,1°C +/- 0,3°C, la óptima de 30°C a 37°C, y la máxima de 45°C. *L. monocytogenes* relativamente resistente al calor si se encuentra en concentraciones muy elevadas del orden de 10⁵ a 10⁶ UFC/mL, pero se ha demostrado que una temperatura de 70°C durante 2 minutos destruye las cepas de *L. monocytogenes* en alimentos cárnicos (ICMSF, 2001).

Listeria monocytogenes puede crecer en un intervalo de pH amplio, desde 4,1 hasta alrededor de 9,6, sin embargo su pH óptimo fluctúa entre 7,2 y 7,6. Este microorganismo es la segunda especie patógena transmitida por alimentos, después de los estafilococos, que es capaz de crecer en valores de actividad de agua (a_w) menores de 0,93 (Jay, 2000; Laciari, 1999). *Listeria monocytogenes* resistente a concentraciones elevadas de NaCl (30%). Desde el punto de vista nutricional no son exigentes, crecen bien en muchos medios de cultivo. A temperaturas entre 20°C y 25°C son móviles (Afnor, 1996).

Tiene la capacidad de fermentar varios carbohidratos formando ácidos, es catalasa positivo, oxidasa negativo, Voges-Proskauer positivo, rojo de metilo positivo e indol negativo, no produce ácido sulfhídrico, no reduce el nitrato y produce β-hemólisis en agar sangre, debido a su producción de listeriolisina O (exotoxina hemolítica y citolítica) (Jay, 2000).

Aunque la mayoría de los casos de listeriosis se dan de forma esporádica, en los últimos años ha despertado un mayor interés debido a las epidemias ocurridas en distintos países asociadas al consumo de determinados alimentos.

En la provincia de Misiones, es tradicional el consumo de quesos frescos que se elaboran en forma artesanal, sin el debido control de calidad.

El objetivo del presente trabajo es determinar la incidencia de *Listeria* spp., en quesos elaborados por pequeños productores que comercializan en distintas ferias de la ciudad de Posadas y del interior de la provincia de Misiones; las muestras fueron recolectadas de los puestos de ventas, al azar con diferentes formas, tamaños y conservadas a distintas temperaturas (ambiente y refrigeración).

Materiales y métodos

Muestreo

Adquisición de las muestras. Se analizaron 60 muestras de queso fresco artesanal, comercializado en puestos de venta de feriantes de la provincia de Misiones, provenientes de diferentes localidades.

Detección cualitativa de *Listeria*

Enriquecimiento. Se colocaron 25 g de muestra en un frasco con 225 mL de *Listeria*, Caldo Base de Enriquecimiento Bufferado según FDA y se llevaron a incubación a 30°C por 24 horas.

Aislamiento de colonias. Pasadas las 24 horas de incubación, se sembraron por estrías en agar Oxford Modificado y en CHROMagar. Se incubaron a 30°C por 24 a 48 horas, luego de transcurrido este tiempo, se seleccionaron cinco colonias y se sembraron en agar TSA-YE. En el Oxford Modificado las colonias tienen un halo negro debido a la hidrólisis de la esculina, con depresión en el centro y diámetro de 2 mm. Los antibióticos (colistina, acriflavina, ceftazidima) inhiben la flora acompañante en el cultivo selectivo de *Listeria*. En el



FRIO-RAF



CERTIFICATE OF AUTHORIZATION
NUMBER 38.152
ASME CODE





EXPERIENCIA



TECNOLOGIA



SERVICIO

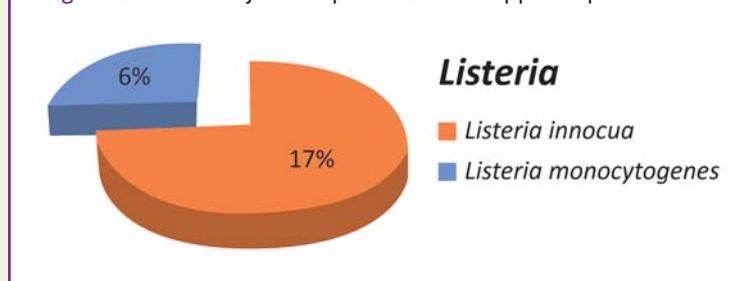


CALIDAD

FRIO-RAF S.A. Lisandro de la Torre 958 - (S2300DAT) Rafaela - Santa Fe - Tel.: +54-3492-432174 - Fax: +54-3492-432160
 Riobamba 178, 1° Piso, Dpto. "C" (C 1025 ABD) Buenos Aires - Argentina - Tel./Fax +54-11-4953-3536
 e-mail: info@frioraf.com - web: www.frioraf.com

Tabla 1: Pruebas Bioquímicas empleadas en la detección de *Listeria* spp.

Especie	Gram	Catalasa	Movilidad	Hemólisis β	Reducción de Ácidos a partir de		
					Manitol	Ramnosa	Xilosa
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	+	+	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>L. innocua</i>	+	+	+	-	-	V	-
<i>L. welshimeri</i>	+	+	+	-	-	V	+
<i>L. seeligeri</i>	+	+	+	+	-	-	+
<i>L. grayi</i>	+	+	+	-	+	V	-

Figura 1 - Porcentaje de cepas de *Listeria* spp. en quesos frescos

CHROMagar el aspecto típico de *L. monocytogenes* es una colonia azul, con diámetro del halo inferior a 3 mm. Se realizó la tinción de Gram y pruebas bioquímicas.

Pruebas bioquímicas

- **Prueba de Catalasa.** Para comprobar la presencia de la enzima catalasa.

- **Fermentación de Carbohidratos.** Caldo púrpura de bromocresol con 0.5% de carbohidrato (manitol, glucosa y xilosa) y se incubó a 35°C por siete días.

- **Movilidad en Medio Semisólido.** Se inoculó por punción en medio semisólido SIM, se incubó por siete días a 22°C y se observó diariamente la movilidad (sombrija).

- **Prueba de Hemólisis.** Se sembró en placas de agar sangre al 5%, se incubó por 24 a 48 horas y se observó el tipo de hemólisis.

- **Prueba de CAMP.** En el centro de una placa con agar sangre se sembró una estría de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y se estriaron transversalmente las cepas sospechosas. Se incubó a 35°C por 24 a 48 horas.

Análisis microbiológicos

Para los recuentos bacterianos se siguieron los procedimientos de International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) y procedimientos nacionales (Código Alimentario Argentino) expresando los resultados en número de unidades formadoras de colonias por gramo (UFC/g).

Recuento de Bacterias Aerobias Mesófilas (BAM). Se utilizó como medio de cultivo el Agar para Recuento en Placas o PCA (Plate Count Agar), se incubó a 35°C durante 48 horas.

Recuento de mohos y levaduras. Se realizó la siembra

con Agar Hongos y Levaduras con cloranfenicol, que se incubó a 25-28 °C durante cinco a seis días.

Recuento de Coliformes Totales y Coliformes Fecales. Se realizó con la técnica de PourPlate, utilizando como medio Agar Violeta Rojo y Bilis (VRBA), incubando a 35° C durante 18-24 horas (coliformes) y a 44° C durante 24 horas (coliformes fecales). Las colonias rojas características se repicaron en caldo Mac Conkey para observación de acidez y gas.

Escherichia coli. Las colonias sospechosas en el agar VRBA desarrolladas a 44°C se repicaron en caldo EC incubando a 45°C, realizando siembra en agar EMB y prueba del IMViC para su confirmación.

Recuento de Staphylococcus aureus coag (+). Se utilizó agar Baird Parker, con siembra en superficie e incubación 35°C durante 24-48 horas. Las colonias sospechosas de *Staphylococcus coag. (+)* se confirmaron con coloración de Gram y las pruebas bioquímicas como coagulasa, TSI, catalasa.

Análisis de Salmonella spp. Para el pre-enriquecimiento, las muestras fueron homogenizadas en caldo peptonado bufferado, incubándose luego durante 24 horas a 35°C. Para el enriquecimiento selectivo se sembraron al 10% en caldos Selenito-Cistina y Rappaport Vassiliades que se incubaron por 48 horas a 41,5°C. Para el aislamiento se utilizaron placas con agar Xilosa-Lisina-Desoxicolato (XLD) y agar Bismuto-Sulfito (BS), los cuales se incubaron a 35°C por períodos variables según los requerimientos. Los ensayos se realizaron por triplicado. Se tomaron cinco colonias sospechosas de *Salmonella* y se incubaron en picos de agar triple azúcar hierro (TSI) y agar lisina hierro (LIA) incubando a 35°C durante 24 horas, continuando luego con las pruebas bioquímicas compatibles con el género *Salmonella* (ureasa, fenilalanina desaminasa, oxidasa, indol, Voges Proskauer, citrato y otras).

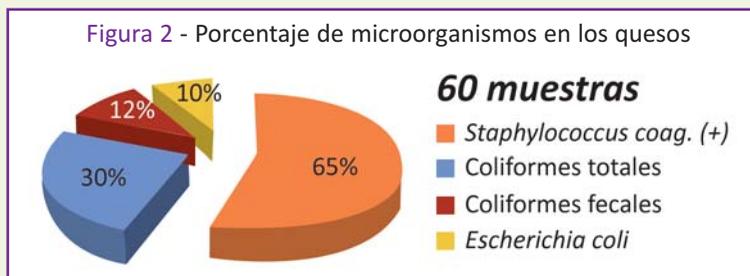
Resultados y discusión

De las 60 muestras de quesos frescos preparados artesanalmente, se detectaron colonias presuntivas en 18 muestras (30%), de las cuales se recuperaron 160 aislamientos con las características de crecimiento de

Tabla 2: Parámetros Microbiológicos especificados en el CAA. (Siendo m: nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable, y M: nivel máximo del microorganismo en el alimento, para una calidad aceptable provisionalmente)

Microorganismos	Quesos de alta humedad (46% < hum. < 55%): (ejemplo Ricota)	Quesos cuartirolo, cremoso, criollo y minas frescal
Coliformes/g (30°C)	m = 5000 M = 10000	m = 10000 M = 100000
Coliformes/g (45°C)	m = 1000 M = 5000	m = 1000 M = 5000
Estafilococos coag. (+) /g.	m=100 M=1000	m=100 M=1000
<i>Salmonella</i> spp/25 g	m = 0	m = 0
<i>Listeria monocytogenes</i> /25g	m = 0	m = 0.1

Figura 2 - Porcentaje de microorganismos en los quesos



Listeria spp., utilizando agar Oxford Modificado y Chromagar *Listeria* como medios selectivos. Luego de realizar las pruebas bioquímicas (Tabla 1), el 17% de las colonias presuntivas estudiadas resultaron positivas para *Listeria innocua* y el 6% presentó características compatibles con *Listeria monocytogenes* (Figura 1). El bajo porcentaje hallado de este microorganismo puede deberse a que muchas muestras se obtuvieron en los puestos de ventas de las ferias, sin envoltorio y al aire libre, a causa de lo cual aumenta la desecación de la superficie externa de los quesos por pérdida de humedad, disminuyendo la supervivencia de estos microorganismos. Baquero Acuña *et al.* (2006) encontraron mayor cantidad de *L. monocytogenes* que de *L. innocua* en quesos artesanales de Colombia, en cambio, nuestros valores se aproximan a los hallados por Espinosa *et al.* (2003) que encontraron un bajo porcentaje de *L. monocytogenes* en quesos artesanales aislados en Perú. Informes previos del grupo de trabajo sobre la calidad de quesos artesanales habían determinado que los quesos presentaban una mala calidad higiénica sanitaria, con un recuento elevado (ca. 3×10^8 UFC/g) de microorganismos viables.

En este trabajo la calidad higiénica sanitaria de los quesos fue regular, presentando recuentos elevados de Bacterias Aerobias Mesófilas ($1,2 \times 10^4 - 3 \times 10^8$ UFC/g) con una media de 5×10^7 UFC/g; Mohos y Levaduras (10^2 a 7×10^8 UFC/g) con una media de 4×10^7 UFC/g. También se observó contaminación fecal que superaba el límite permitido por el CAA (Tabla 2) de Coliformes Totales (30%) y Coliformes Fecales (12%), con presencia de *Escherichia coli* en el 10% de las muestras (Figura 2). *Staphylococcus coag. (+)* también fue detectado en un elevado porcentaje de los quesos (65%) mientras que no se detectó *Salmonella* spp (ausencia en 25g, CAA).

Conclusiones

Los resultados reflejan que estos productos presentan deficiencias en el manipuleo, conservación, envases, etc. La presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos de alto consumo en esta provincia, como son los quesos frescos artesanales, representa un riesgo potencial para la salud de los consumidores. Por eso se sugiere más capacitación continua a los productores que elaboran y venden los quesos para minimizar la contaminación del producto terminado.

Agradecimientos

Al Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT)- Centro de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CeDiTec)- Provincia de Misiones.

Bibliografía

- Association Française de Normalisation AFNOR (1996). NF ISO 11290- 1: Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 1: detection method.
- Axelsson F, Sonrin M. Transia. (1998) *Listeria*. Technical Handbook. Sweden: Diffchamb AB.
- Baquero Acuña Deissy Milena, Astrid Marcela Bernal González, Silvia Campuzano. (2006). "Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos artesanales expendidos en la plaza de mercado de Cáqueza, Cundinamarca". NOVA - Publicación Científica - ISSN 1794-2470, Vol.4, No.6, p.1-114.
- Bell C, Kyriakides A. (1998). *Listeria*. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos. España. Acribia.
- Código Alimentario Argentino (CAA). Cap. VIII: Alimentos Lácteos. Art.605.
- Donely, Brackett, Doores, Lee, Lovett. (1992). *Listeria*. In: Vanderzant C, Splittstooser DF, (eds). Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3rd ed. Washington DC: American PublicHealthAssociation. p. 637-63.
- Espinosa Ana, Magali de La Torre, Marianella Salinas, Víctor Sánchez. (2004). "Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del Distrito de ICA". Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública - ISSN 1726-4634, Vol.21 No.2, p.71-75.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 2001. Métodos recomendados para análisis microbiológico en alimentos. Microorganismos de los Alimentos I., Técnicas de Análisis Microbiológicos (2da. Ed.) Acribia Zaragoza, España.
- Jay J.M. (2000). Microbiología moderna de los alimentos. Cuarta Edición. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza.p. 457-480.
- Laciar A.L, Vaca L, De Centorbi O.N.P. (1999). *Listeria* spp., en alimentos de origen animal. Revista Argentina de Microbiología. Vol 31: 25-30.
- Ministerio de Agricultura. (1999). Oficina de Información Agraria. Producción Pecuaria e Industria Avícola. Lima. 54.
- Pellicer K, Copes J, Malvestiti L, Lafranchi M, Stanchi N, Echevarría G, Nosetto E. (2002). Aislamiento e Identificación de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. En embutidos secos obtenidos en mercados de la ciudad de La Plata. Revista Argentina de Microbiología. 34, 219-221.
- Porto E, Eiroa M.N. (2001). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. DairyFood EnvironSanit; 21: 282-6.