

## Evaluación de *Listeria spp.* en muestras ambientales en una Empresa de Producción Artesanal de Quesos Frescos en La Provincia de Los Santos

Martha Ch. de Von Chong. MSc.<sup>1</sup>, Roberto J. García G.<sup>2</sup>, Ambiorix Batista Q.<sup>3</sup>,  
Denisse M. Broce C.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>MSc. en Microbiología. Profesora, Tiempo Completo, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, C.R.U.C., C.R.U.A, Universidad de Panamá, Panamá. E-mail: kmvonchong@cwpanama.net.

<sup>2</sup>Lic. en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, C.R.U.A., Universidad de Panamá, Panamá. E-mail: vigarob@hotmail.com.

<sup>3</sup>Lic. en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, C.R.U.A., Universidad de Panamá, Panamá. E-mail: ambiorix72@hotmail.com

<sup>4</sup>Lic. en Biología con orientación en Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Panamá, Panamá. 3M E-mail: dbroce@mmm.com

### RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar *Listeria spp.* en muestras ambientales tomadas dentro de una empresa de producción artesanal de quesos frescos blancos, ubicada en la Provincia de los Santos, durante los meses de diciembre de 2008 a marzo de 2009. Las muestras fueron tomadas por triplicado en dos sitios de las zonas de contacto directo y dos sitios de contacto indirecto con el alimento. De las 72 muestras evaluadas, el 70% fueron positivas para *Listeria spp.* encontrándose diferencias altamente significativas al 99% de probabilidad estadística, en la cuantificación entre las zonas de contacto directo (46.7%), e indirecto (36.3%), con el alimento.

En los aislamientos no se detectó *Listeria monocytogenes*, en ninguna de las muestras positivas para *Listeria spp.*, pero se detectaron otras especies de *Listeria*, que fueron *L. seeligeri*, *L. grayi* y *L. welshimeri*, demostrando estos resultados que *Listeria monocytogenes* podría aparecer con la probabilidad de formar reservorios potenciales, como biopelículas.

### PALABRAS CLAVES

*Listeria spp.*, quesos frescos, empresa artesanal, alimentos, biopelículas.

### SUMMARY

The aim of this investigation was to evaluate *Listeria spp.* in environmental samples taken inside a company of handcrafted production of fresh white cheeses, located in the Province of The Saints, during December, 2008 to March, 2009. The samples were taken by triplicate in two sites of the zones of direct contact and two sites of indirect contact by the

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

food. Of 72 evaluated samples, 70 % was positive for *Listeria* spp. being highly significant differences to 99 % of statistical probability, in the quantification between the zones of direct contact (46.7 %), and indirectly (36.3 %), with the food. In the isolations *Listeria monocytogenes* was not detected, in any of the positive samples for *Listeria* spp., but there were detected other *Listeria*'s species, which were *L. seeligeri*, *L. grayi* and *L. welshimeri*, demonstrating these results that *Listeria monocytogenes* might appear with the probability of forming potential reservoirs, as biofilms.

### KEY WORDS

*Listeria* spp., fresh cheeses, handcrafted company, food, biofilms.

### INTRODUCCION

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* spp. son cocobacilares, Gram positivas, no esporuladas, presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 25° C, pero no a 37° C. Sus colonias son y lisas, su temperatura óptima de crecimiento está entre 30° C y 37° C, pero pueden crecer a 4° C, -psicrófilas- (Alós y col. 2002; De la Rosa, 2003; Rojas y col. 2006). *Listeria* spp. es una bacteria ubicua que se encuentra distribuida principalmente en el pasto desde donde contamina tanto a los vegetales como a los animales y posteriormente pasa a los alimentos. El crecimiento de *Listeria* spp. está influenciado por muchas condiciones ambientales tales como la temperatura, la actividad de agua, y la accesibilidad a los nutrientes, estas bacterias son relativamente exigentes, creciendo mejor en medios enriquecidos (Díaz y col. 2003; Vera y col. 2001; Moreno y col. 2005).

La presencia de *Listeria* spp. ha sido documentada como una realidad presente en plantas procesadoras de alimentos en muchos países del mundo, entre los cuales figuran, España, Estados Unidos, Perú, Venezuela, Cuba, Argentina, Chile, Inglaterra, etc. Diferentes estudios han demostrado que en estas plantas, *Listeria* spp. puede permanecer latente durante largos períodos de tiempo. (Martino y col. 2005; Figuera y col. 2005; Alcázar y col. 2006). Además estas bacterias se caracterizan por ser grandes formadoras de biopelículas, que son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a las superficies gracias a la secreción de un exopolímero. Diversos estudios han demostrado que las diferentes tasas de crecimiento de las cepas de *Listeria* spp., las interacciones con el alimento en la fase de enriquecimiento y la producción de bacteriocinas son factores que afectan la ecología microbiana de las distintas especies de *Listeria*, presentes en la matriz alimentaria, lo que favorece la recuperación de unas especies en detrimento de otras. (Rodríguez, 2001; Pelisser y col. 2001; Cabrera y col. 2004).

Las colonias típicas de *Listeria* spp., una vez aisladas en medio selectivo/diferencial, se seleccionan para su identificación a nivel de especie, utilizando una galería de pruebas bioquímicas. (koneman y col., 2005). *Listeria* spp. no son consideradas como bacterias patógenas, pero si son indicativas de la posible presencia de *Listeria monocytogenes*, la cual es catalogada como un patógeno facultativo intracelular que puede evitar la eliminación mediada por anticuerpos. (Davis y col. 1985; Moreno y col. 2005).

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

Algunos de los estudios realizados por investigadores del sector público y privado a nivel mundial con referencia a este microorganismo en ambientes, señalan que en el ámbito industrial de producción alimentaria, primero se produce una contaminación en las superficies de acero inoxidable de los equipos y máquinas y posteriormente, pasan a contaminar el producto de manera directa o indirecta con el microorganismo. En este sentido, El Servicio de Inspección de Seguridad Alimentaria y la Administración de Drogas y Alimento de los Estados Unidos, han identificado el *Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control* (HACCP), al igual que las *Buenas Prácticas de Manufactura* (BPM) como las estrategias más eficaces para controlar la presencia de *L. monocytogenes* y otras bacterias patógenas en los productos alimentarios (USDA/FDA/CDC, 2008).

*L. monocytogenes* es altamente variable y mediante la caracterización del peligro en relación a la dosis-respuesta, algunos de los factores que intervienen en esta variabilidad son la virulencia de la cepa, la susceptibilidad del huésped, la matriz alimentaria, y el número de bacterias ingeridas, según la Evaluación de Riesgos Microbiológicos elaborada por la Comisión Mixta FAO/OMS del Códex Alimentarius (CAC) y el Comité del Códex sobre Higiene de los Alimentos (CCFH) en el año 2004.

Es la causante de la Listeriosis, siendo una de las enfermedades más importantes de transmisión por alimentos (ETA's). Las manifestaciones de la enfermedad en el hombre comprenden septicemia, meningitis o meningoencefalitis y encefalitis, habitualmente precedidas de síntomas parecidos a los de la gripe, incluida la fiebre, en mujeres gestantes, las infecciones intrauterinas o cervicales pueden provocar abortos espontáneos o nacidos muertos, entre otras. La población más vulnerable la forman los ancianos, las mujeres gestantes, los recién nacidos y los individuos inmunodeprimidos. (Davis y col. 1985).

Este estudio brindará mayor información a las autoridades nacionales pertinentes, en materia de salud y alimentación, para la ejecución de normas, acerca de este indicador ambiental, y por consiguiente, ayudará a recopilar antecedentes para estudios de carácter científico relacionados con el análisis microbiológicos de superficies de contacto directo e indirecto con los alimentos, en plantas procesadoras, para evitar la patogenicidad causada por el género *Listeria* spp. en los seres humanos. En la actualidad, en materia de este indicador ambiental en la República de Panamá, no existe legislación.

## METODOLOGÍA

### Diseño Experimental del Muestreo:

El diseño experimental se basó en clasificar el área estudiada dentro de la empresa, en superficies de contacto directo e indirecto con los alimentos. Las superficies fueron monitoreadas en un período de tres meses en total, dentro de los cuales los sitios elegidos se muestrearon seis veces. Esta etapa fue llevada a cabo durante los meses de diciembre de 2008 a marzo de 2009. Fueron tomadas 72 muestras en superficies ambientales en la empresa utilizando esponjas húmedas como revivificantes, en un área superficial de 90cm<sup>2</sup> adaptándose a la unidad experimental de las cuales se hicieron replicas en los sitios de las zonas de contacto directo e indirecto con el alimento.

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

**Procesamiento:**

Las muestras se trasladaron a La Unidad de Investigaciones Biológicas del Centro Regional Universitario de Azuero (C.R.U.A.), en donde se realizó los análisis microbiológicos. Cada una de las muestras se transportó dentro de su respectiva bolsa Hydra Sponge, conteniendo diez mililitros de caldo neutralizante Leethen, bajo refrigeración a 4° C. Al llegar al laboratorio se agregó a cada muestra 90 ml de agua peptonada buferada estéril (1/9) colocándose en reposo a temperatura ambiente por cuatro horas para desestresar los microorganismos (muestra madre  $10^{-1}$ ). Luego de 4 horas, se tomó 1 ml de la muestra madre ( $10^{-1}$ ) y se llevó al caldo de preenriquecimiento selectivo para *Listeria* spp. (Demi-Frazier Broth Base), suplementado con citrato que contenía 9 ml, siendo esta la segunda dilución ( $10^{-2}$ ). Del mismo modo a partir de la segunda dilución se tomó 1 ml de dicho caldo y se llevó nuevamente a 9 ml (1/9) del caldo de enriquecimiento (D. Frazier suplementado con citrato), para tener finalmente una tercera dilución ( $10^{-3}$ ). Los tubos de ensayo conteniendo ambas muestras diluidas se colocaron en una gradilla y se incubaron por 48 horas a 37° C.

Transcurrido el período de incubación de 48 horas, se procedió a sembrar las muestras diluidas utilizando el Agar Selectivo Ottaviani & Agosti, utilizado para el aislamiento y recuento de *Listeria* spp. en muestras ambientales, siguiendo el protocolo establecido por Biomériux (Ottaviani & Agosti 2004). Para el aislamiento en este medio se tomó 0.1 ml de los tubos de ensayo que contenían la segunda y tercera dilución ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) respectivamente, y se procedió a sembrar por esparcido en platos petris conteniendo éste Agar selectivo, cada plato inoculado fue rotulado y sellado con parafilm, luego se incubaron durante 48 horas. Los platos sembrados por semana fueron en total veinticuatro (doce conteniendo la dilución  $10^{-2}$  y doce la dilución  $10^{-3}$ ).

La cuantificación se realizó luego de transcurridas las 48 horas de incubación a 37° C, las colonias características de *Listeria* spp. crecieron de color azul verdosas, otras colonias contaminantes que no eran *Listeria* spp. crecieron de color blanco. Los resultados obtenidos fueron tabulados por sitios de muestreo, (contacto directo e indirecto) y por factor de dilución ( $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ), al igual que por horas de lectura (24 y 48 horas). El número de colonias obtenidas en el recuento, se multiplicó por su factor respectivo factor de dilución, para así obtener el conteo en UFC/ cm<sup>2</sup>.

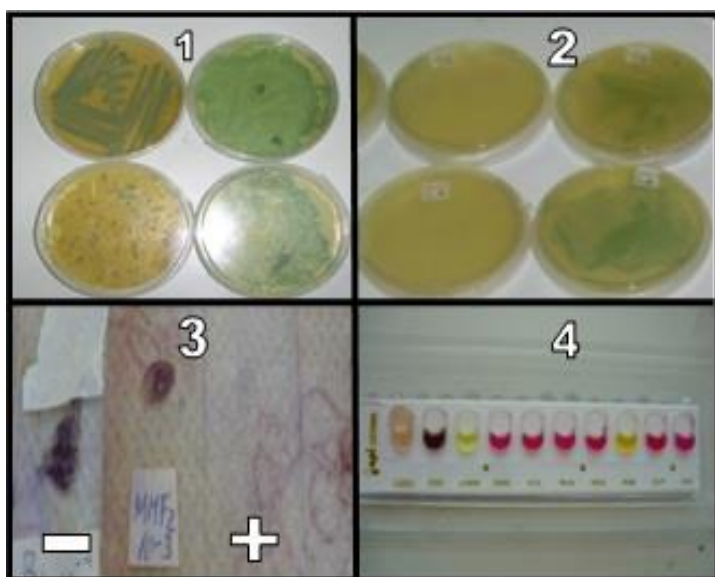
**Aislamiento y Cuantificación:**

Los cultivos puros se analizaron empleando la tinción de Gram para ver coloración y morfología, además de la prueba de Catalasa positiva y Oxidasa negativa, seleccionándose colonias que presentaron características típicas de *Listeria* spp. que fueron sembradas nuevamente en Agar *Listeria monocytogenes* según Ottaviani & Agosti, y fueron incubadas por 48 horas a 37° C. Las bacterias Gram positivas, presentaron una forma cocobacilar y una coloración púrpura o morada; se llevaron las placas a observación empleando el microscopio compuesto de luz, utilizando aumento de 100 X, en donde se pudo observar la presencia de bacterias cocobacilares con extremos redondeados características del Género *Listeria* spp.

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>



### Identificación Confirmativa mediante Pruebas Bioquímicas y Serológicas:

Para la aplicación de las pruebas bioquímicas, se utilizaron cultivos puros y aislamientos de *Listeria* spp. cuyas colonias se visualizan de azul turquesa. De igual manera se muestran pruebas positivas para Catalasa y negativas para Oxidasa junto con la Galería API *Listeria* dando positivas sus reacciones. (Ver figuras 1,2,3,4).

**Figura 1:** Aislamientos de *Listeria* spp. que se aprecian de otros géneros competitivos.

**Figura 2:** Cultivos puros cuyas colonias se visualizan de azul turquesa.

**Figura 3:** Pruebas positivas para Catalasa (burbujeo) y negativas para Oxidasa.

**Figura 4:** Galería API *Listeria* dando positivas sus reacciones según su color y código.

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá. C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología. Departamento de Microbiología.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos para *Listeria* spp. en las muestras ambientales de la empresa, fueron analizados mediante el uso de una prueba no paramétrica, de distribución de datos que compara la discrepancia y correlación entre dos o más variables, conocida como  $X^2$  (Prueba de Ji-cuadrada) de Pearson. En esta investigación se encontraron diferencias altamente significativas de probabilidad al 0.001 la cual es menor a la permitida siendo esta probabilidad de error  $< 0.01$  al 99% de confiabilidad, entre las zonas de contacto directo versus las de contacto indirecto con la materia prima y entre el total de las semanas analizadas que constituyeron nuestras réplicas (Ver Cuadro 1 y Gráfica 1).

**Cuadro 1.**

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

**Valores generales por semana para la lectura de *Listeria* spp. a las 24 horas versus a las 48 horas según la distribución de medias de la prueba de  $X^2$  de Pearson expresadas en UFC/cm<sup>2</sup>.**

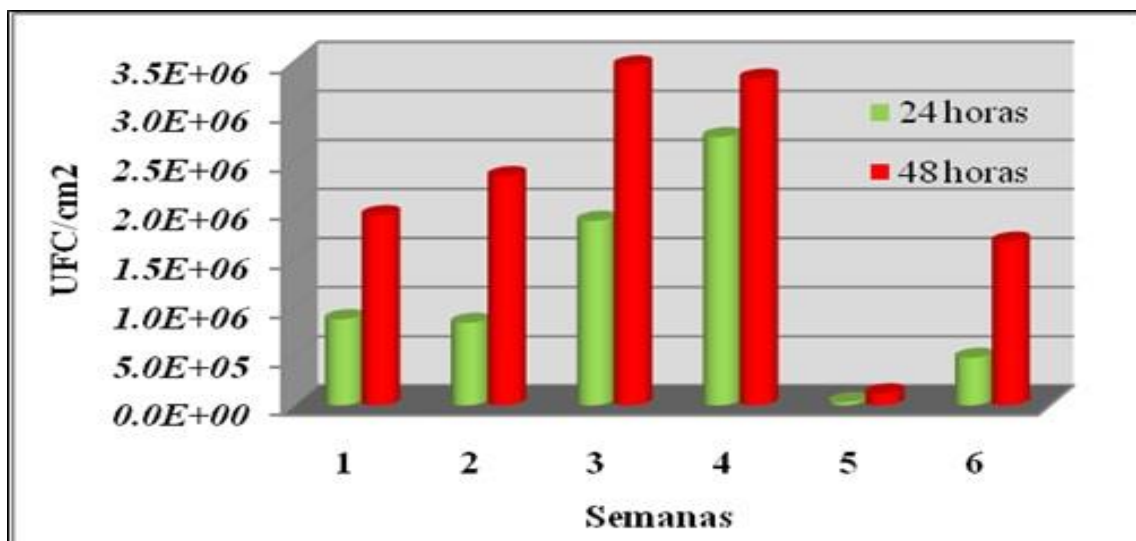
Semanas	Distribución $X^2$ de Pearson	
	Lectura a las 24 horas	Lectura a las 48 horas
1	875,833.4	1,936,375.0
2	840,000.2	2,335,000.0
3	1,879,167.0	3,462,500.0
4	2,733,333.0	3,329,167.0
5	31,250.0	120,833.3
6	483,333.3	1,666,710.0
<b>Grados de Libertad = 5 / Probabilidad = 0.001</b>		

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá. C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología. Departamento de Microbiología.

#### Gráfica 1.

**Valores generales por semana para la lectura de *Listeria* spp. a las 24 horas versus a las 48 horas.**

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá. C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología.



Departamento de Microbiología.

#### Cuadro 2.

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

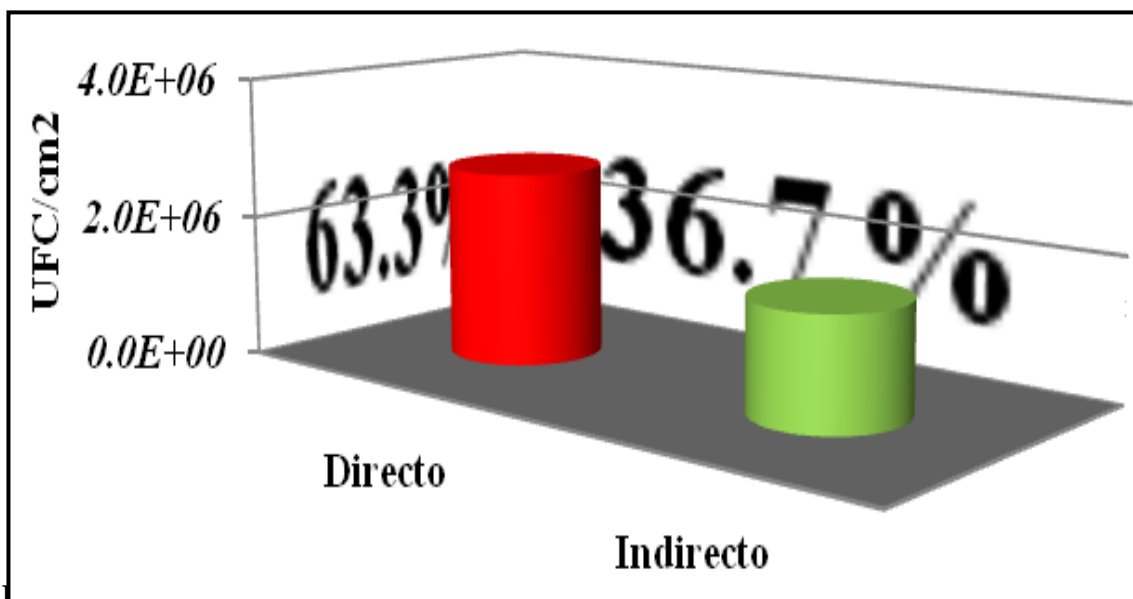
Valores generales para la lectura de *Listeria* spp. a las 48 horas entre las zonas de contacto directo versus a las zonas de contacto indirecto, según la distribución de medias de la prueba de  $\chi^2$  de Pearson expresadas en UFC/cm<sup>2</sup>.

Zonas de Contacto	Distribución $\chi^2$ de Pearson	Porcentaje
<b>Directo</b>	2,729,306.00	63.3 %
<b>Indirecto</b>	1,554,223.00	36.7 %
<b>Grados de Libertad = 1 / Probabilidad = 0.001</b>		

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá. C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología. Departamento de Microbiología.

### Gráfica 2.

Comparación de los valores de *Listeria* spp. entre las Zonas de Contacto Directo versus a las Zonas de Contacto Indirecto a las 48 horas de lectura.



C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología. Departamento de Microbiología.

### Cuadro 3.

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

**Relación de los valores generales para la lectura de *Listeria* spp. a las 48 horas por Unidades Experimentales entre las Zonas de Contacto Directo versus a las Zonas de Contacto Indirecto, según la distribución de medias de la prueba de  $\chi^2$  de Pearson expresadas en UFC/cm<sup>2</sup>.**

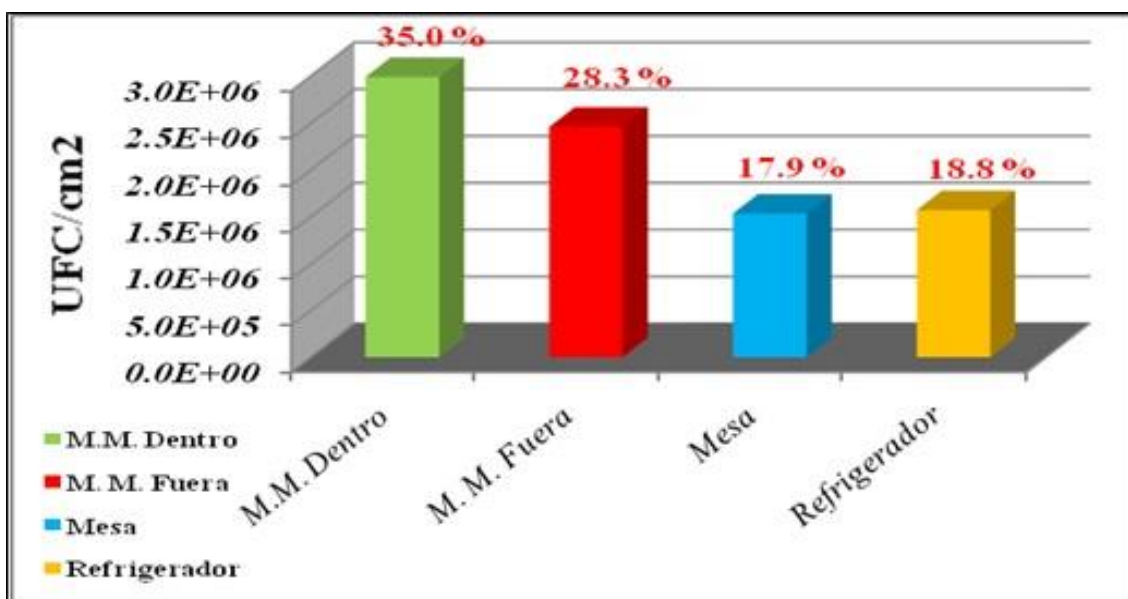
Unidad Experimental	Distribución $\chi^2$ de Pearson
Máquina de Moler (Parte Interna)	2,994,723.00
Máquina de Moler (Parte Externa)	2,463,889.00
Mesa	1,536,222.00
Refrigerador	1,572,223.00
<b>Grados de Libertad = 1 / Probabilidad = 0.001</b>	

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá. C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología. Departamento de Microbiología.

### Gráfica 3.

**Relación de los valores generales para la lectura de *Listeria* spp. por Unidades Experimentales entre las Zonas de Contacto Directo versus las Zonas de Contacto Indirecto.**

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá.



C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología. Departamento de Microbiología.

### Cuadro 4.

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>



**Relación de los valores para la lectura de *Listeria* spp. a las 48 horas por Semana versus Unidades Experimentales, según la distribución de medias de la prueba de  $X^2$  de Pearson expresadas en UFC/cm<sup>2</sup>.**

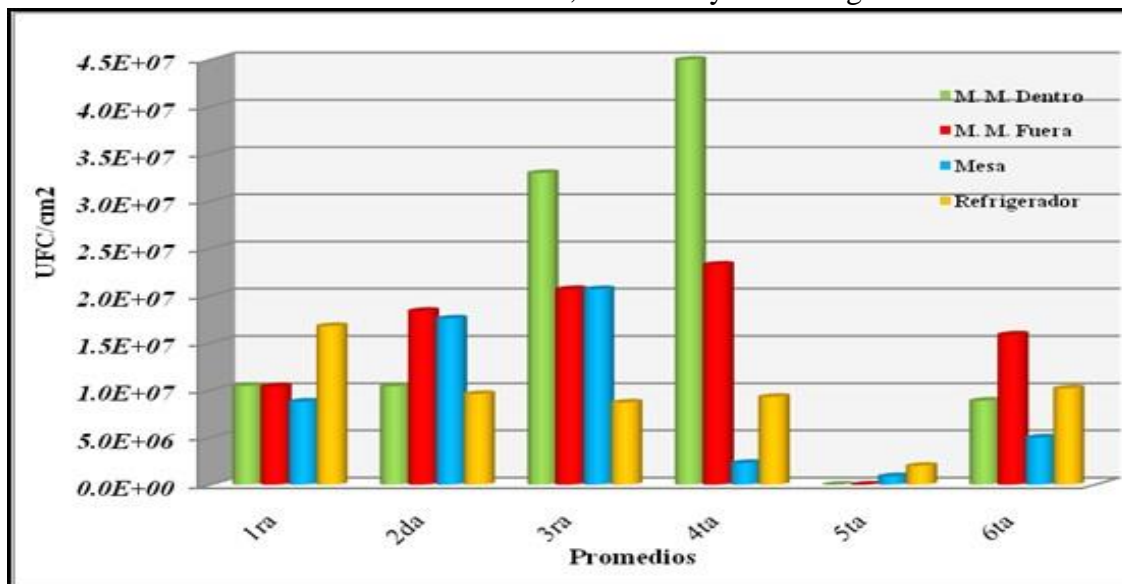
Semana (Réplicas)	Distribución $X^2$ de Pearson en las Unidades Experimentales			
$X_i^2$	Máquina de Moler (Parte Interna)	Máquina de Moler (Parte Externa)	Mesa	Refrigerador
1 <sup>ra</sup>	10,470,000.0	10,400,000.0	8,803,000.0	16,800,000.0
2 <sup>da</sup>	10,440,000.0	18,400,000.0	17,600,000.0	9,600,000.0
3 <sup>ra</sup>	33,000,000.0	20,700,000.0	20,700,000.0	8,700,000.0
4 <sup>ta</sup>	45,000,000.0	23,300,000.0	2,300,000.0	9,300,000.0
5 <sup>ta</sup>	0	0	900,000.0	2,000,000.0
6 <sup>ta</sup>	8,900,011.0	15,900,000.0	5,001,002.0	10,200,000.0
<b>Grados de Libertad = 15 / Probabilidad = 0.001</b>				

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá. C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología. Departamento de Microbiología.

#### Gráfica 4.

**Relación de los valores para la lectura de *Listeria* spp. a las 48 horas por Semana versus Unidades Experimentales.**

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá. C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología.



Departamento de Microbiología.

#### Cuadro 5.

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

**Resultados obtenidos en la identificación de las especies de *Listeria* spp. mediante pruebas bioquímicas aplicadas a cultivos puros de cepas y colonias frescas.**

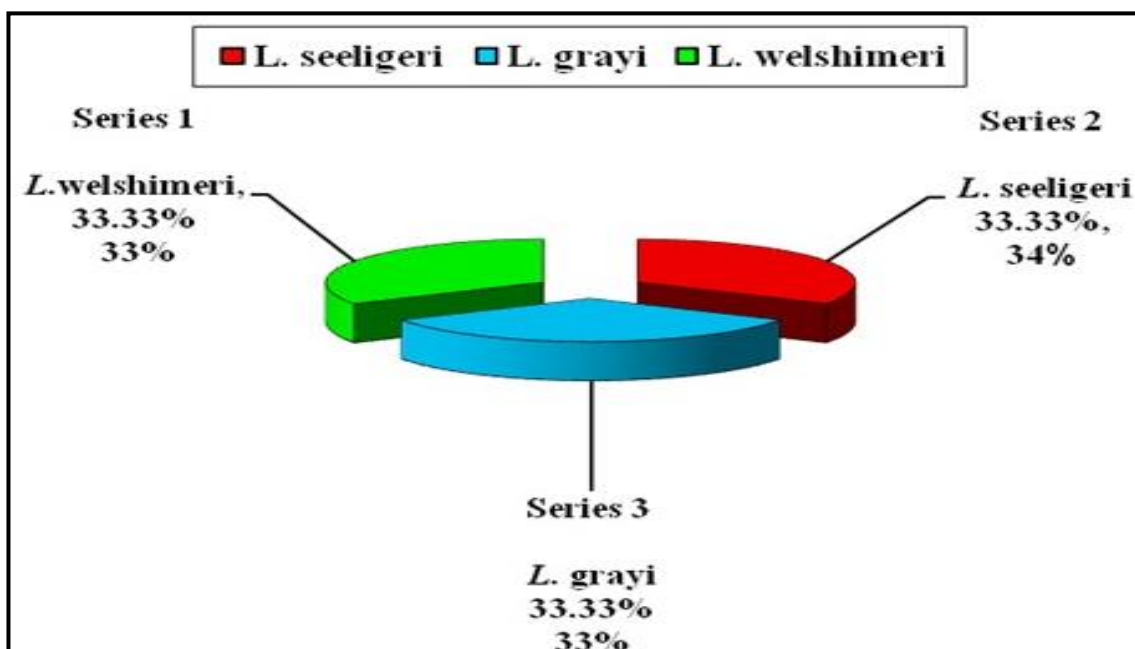
Tinción de Gram	Semanas	Catalasa	Oxidasa	API <i>Listeria</i> (Código)	Especie resultante
Formas coco-bacilares de coloración purpura o violeta	1 <sup>ra</sup>	+	-	6200	<i>L. seeligeri</i>
	2 <sup>da</sup>	+	-	2021	<i>L. grayi</i>
	3 <sup>ra</sup>	+	-	6221	<i>L. welshimeri</i>
	4 <sup>ta</sup>	+	-	6020	<i>L. grayi</i>
	5 <sup>ta</sup>	+	-	6200	<i>L. seeligeri</i>
	6 <sup>ta</sup>	+	-	6221	<i>L. welshimeri</i>

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá. C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología. Departamento de Microbiología.

**Gráfica 5.**

**Porcentajes de presencia de *Listeria* spp. al realizar pruebas de confirmación bioquímica por medio de la prueba API para *Listeria* spp.**

**Fuente:** Von Chong, M.; Batista, A.; García, R.; Broce, D. 2009. Universidad de Panamá.



C.R.U.A. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología. Escuela de Biología. Departamento de Microbiología.

**DISCUSIÓN**

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

Este estudio ha permitido establecer que existen diferencias altamente significativas en la evaluación de *Listeria* spp. obtenidas en las superficies ambientales de monitoreo en sitios de contacto directo versus los sitios de contacto indirecto con la materia prima, en una empresa de producción artesanal de quesos frescos. Dichas diferencias fueron encontradas al realizar los análisis estadísticos, mediante la prueba de distribución de medias de  $X^2$  de Pearson, la cual midió la discrepancia entre estas dos variables. Hay que destacar que los monitoreos se realizaron en el mismo momento en que se llevaba a cabo el proceso de la fabricación del queso fresco blanco. Al realizar los análisis estadísticos, se observa en el **Cuadro 1.** los valores generales por semana que arrojó la lectura de *Listeria* spp. en UFC/cm<sup>2</sup> a las 24 y 48 horas de incubación, siendo mayor la lectura en todas las semanas y/o réplicas a las 48 horas y esto se hace más evidente en las semanas 1, 2 y 6 cuando las diferencias pasan del doble.

En la **Gráfica 1.** se aprecia que las semanas 3 y 4 tienen el mayor índice de crecimiento, contrastando con la semana 5, donde el valor resultante es el más bajo, debido a que a la hora de realizar el monitoreo rutinario, aún no se había empezado el proceso de producción, demostrando entonces que el origen de la contaminación de *Listeria* spp. se debe en gran medida a deficientes condiciones higiénicas de manufactura, como lo establece **Cutter y col. (2006)**, afirmando que la presencia de este microorganismo en dichas plantas de producción de alimentos es propicia para que ocurra contaminación cruzada, ya que el microorganismo es transferido de una superficie a otra contaminando los alimentos inocuos y a los equipos limpios debido a la existencia de las biopelículas. Igualmente este indicador puede sobrevivir en el ambiente, debido a la entrada y salida de personal, de la materia prima y del producto terminado haciendo muy difícil su control.

Al comparar los valores generales para la lectura de *Listeria* spp. a las 48 horas entre las superficies ambientales de contacto directo e indirecto con la materia prima, como aparece en el **Cuadro 2.** Este estudio ha podido confirmar que sí existen diferencias altamente significativas en la evaluación de este género bacteriano con un 63.3 % de presencia en las zonas de contacto directo y un 36.7 % las zonas de contacto indirecto, en donde el crecimiento de *Listeria* spp. está influenciado por la temperatura, la actividad de agua, y la accesibilidad a los nutrientes, siendo estas bacterias relativamente exigentes (**Díaz y col. 2003**).

Apoyándonos en la relación existente entre los sitios ambientales monitoreados, en el **Cuadro 3.** se aprecia que el punto monitoreado denominado **Máquina de Moler Dentro** obtuvo el mayor recuento con porcentaje de 35 % en la zona de contacto directo, mientras que el punto monitoreado denominado **Refrigerador** obtuvo el mayor recuento con un porcentaje de 18.4 % en la zona de contacto indirecto, pero fue el tercero si se compara con los cuatro puntos, y resultó así dada las condiciones ambientales para su crecimiento (**Díaz y col. 2003**).

Además, en la comparación de los valores para la lectura de *Listeria* spp. a las 48 horas por semana y unidad experimental, que forma parte del **Cuadro 4.** en donde se

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

obtuvo una probabilidad  $<0.001$  que nos indica que existe dependencia significativa entre los dos factores donde los conteos de *Listeria* spp. en las diferentes unidades experimentales están influenciadas por las semanas.

Así podemos observar que la unidad con el mayor conteo fue la **Máquina de Moler Dentro** (contacto directo), con un promedio de  $3.3 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup> y  $4.5 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, y esto sucedió así sólo en las semanas 3<sup>ra</sup> y 4<sup>ra</sup> respectivamente mientras que en las demás no fue así. Sin embargo, en la primera semana el **Refrigerador** (contacto indirecto) obtuvo un promedio de  $1.047 \times 10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>. Observamos también que la semana de menor cantidad de *Listeria* spp. fue en la 5<sup>ta</sup> e igualmente las unidades experimentales con menor promedio, en general, fueron la **Máquina de Moler Dentro y la Máquina de Moler Fuera** en dichas semanas.

Otro resultado interesante se observa en la 5<sup>ta</sup> semana, en donde el crecimiento de *Listeria* spp. para las unidades experimentales de contacto directo e indirecto disminuyeron, debido a que el muestreo se realizó antes del procesamiento, sin embargo, tiene un sentido lógico que es característico de la especie patógena *L. monocytogenes*, vivir y crecer a temperaturas de refrigeración (menos de 4° C, en esta semana el crecimiento fue mayor en el refrigerador) y a pesar de que crece lentamente a esta temperatura, el largo tiempo de refrigeración de muchos alimentos listos para consumir, podría darle al microorganismo la oportunidad de crecer a niveles peligrosamente altos según lo afirman **Cutter y col. (2006)**. También es posible que cuando en los alimentos hay una carga elevada de microorganismos de alteración, éstos compitan por el espacio y los nutrientes, igualmente influyen las diferentes tasas de crecimiento de las cepas de *Listeria* spp., las interacciones con el alimento en la fase de enriquecimiento y la producción de bacteriocinas, en las distintas semanas de monitoreo ambientales realizadas en la empresa.

Todo lo anteriormente expuesto, constituyen factores que afectan la ecología microbiana de las distintas especies de *Listeria* spp. presentes en la matriz alimentaria, lo que favorece la recuperación de unas especies en detrimento de otras según **Rodríguez, (2001) y Pelisser y col. (2001)** detectándose algunas especies en pruebas bioquímicas realizadas, no así el patógeno denominado *Listeria monocytogenes*, la cual no pudo ser aislada en esta investigación. Las especies de *Listeria* spp. que se aislaron e identificaron en este estudio mediante el empleo de pruebas bioquímicas fueron las siguientes: *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*.

Adicionalmente, estudios comprobados afirman que tanto *L. innocua* como las demás especies identificadas en esta investigación, que forman dicho Género, comparten el nicho ecológico con *L. monocytogenes* y se ha admitido que tienen ventaja competitiva frente a este patógeno, por tener una velocidad específica de crecimiento superior (**Gallegos y col. 2007**). Probablemente por esta razón no pudimos encontrar este patógeno emergente oportunista.

## CONCLUSIONES

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

- Existen diferencias altamente significativas entre las zonas de contacto directo con la materia prima y las zonas de contacto indirecto, en base al recuento de *Listeria* spp. obtenidos en la investigación.
- En la zonas de contacto directo el crecimiento de *Listeria* spp. fue de 63.3 % mientras que en las zonas de contacto indirecto fue de 36.7 %.
- La unidad experimental con mayor recuento de *Listeria* spp. resultó ser la Máquina de Moler Dentro con un porcentaje de 35 % en la zona de contacto directo.
- La unidad experimental con mayor recuento de *Listeria* spp. en la zona de contacto indirecto fue el Refrigerador con un porcentaje de 18.4 %.
- Existe gran dependencia entre las semanas monitoreadas y el recuento de *Listeria* spp. en muestras ambientales, dentro de la empresa de producción artesanal de quesos frescos.
- Se aislaron tres especies del Género *Listeria* spp. las cuales fueron *L. seeligeri*, *L. grayi*, *L. welshimeri*.

### AGRADECIMIENTOS

Al Sr. Ramón Batista. Gerente General de Productos Lácteos Doña Mery, Provincia de Los Santos. A la Doctora Clara Rodríguez; Supervisora Regional de Ventas; Food Safety Department; 3M Panamá. A la Lic. Adriana Chacón (Madex Corporation).

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

### LITERATURA CITADA

1. ALCÁZAR, C.; RUBIO, M.; NUÑEZ, F.; ALONSO, R. 2006. Detección de *Salmonella* spp. y *Listeria monocytogenes* en quesos frescos y semimaduros que se expenden en vía pública en la ciudad de México. Revista Vet. México, 37(4): 417-429. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/espanol/e-htms/e-vetmex/em-vm.htm>.
2. BATISTA A.; GARCIA R. 2009. Evaluación de *Listeria spp.* en muestras ambientales en una Empresa de Producción Artesanal de Quesos Frescos en La Provincia de Los Santos. Universidad de Panamá. Centro Regional Universitario de Azuero. Facultad de Ciencias Naturales y Exactas. Tesis de Licenciatura.
3. BIOMÉRIUX. 2007. Sistema de Identificación de *Listeria*. API Listeria. Francia. Biomeriux Internacional.
4. CABRERA, C.; HURTADO, A.; PEREZ, M. 2004. Búsqueda de *Listeria spp.* en quesos frescos procesados en Rancherías del Municipio de Tecate. Universidad Autónoma de Baja California. Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Disponible: [www.uaemex.mx/Red\\_Ambientales/docs/congresos/Ciudad%20Obregon/TOXICOLOGIA\\_Y\\_SALUD/TXA009.doc](http://www.uaemex.mx/Red_Ambientales/docs/congresos/Ciudad%20Obregon/TOXICOLOGIA_Y_SALUD/TXA009.doc)
5. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. 2008. Listeriosis. United States Department of Health and human Services. Disponible: [http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease\\_listing/listeriosis\\_gi.html](http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/listeriosis_gi.html).
6. COMISIÓN DEL CÓDEX ALIMENTARIUS. 2008. Anteproyecto de Directrices para el Control de *Listeria Monocytogenes en los Alimentos*. Comité del Códex sobre Higiene de

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

los Alimentos. Programa conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Cuadragésima (40) Reunión.

Disponible en: [www.codexalimentarius.net/download/report/714/fh40\\_01s.pdf](http://www.codexalimentarius.net/download/report/714/fh40_01s.pdf)

7. COMISIÓN MIXTA FAO/OMS DEL CÓDEX ALIMENTARIUS (CAC); COMITÉ DEL CÓDEX SOBRE HIGIENE DE LOS ALIMENTOS (CCFH). 2004. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo; resumen interpretativo. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/008/y5393s/y5393s00.pdf>
8. CUTTER, C.; MCELROY, C.; PENN, S. 2006. El control de *Listeria monocytogenes* en Establecimientos de Ven al Consumidor o al Detalle. College of Agricultural Sciences Agricultural Research and Cooperative Extension. Penn-State University, en cooperación con el Servicio de Inspección e Inocuidad Alimentaria del USDA y la Asociación de Oficiales de Alimentos y Medicinas. Estados Unidos. Disponible en: [www.cas.psu.edu](http://www.cas.psu.edu).
9. DAVIS, B.; DULBECCO, R.; EISEN, H.; GISENBERG, H.; WOOD, B. 1973. Microbiology, Chapter 41. Other Pathogenic Bacteria. second edition. Haper & Row, Publishers Inc. Hagerstown, Maryland. Pages. 946-948.
10. DÍAZ G.; FERRÁN J. 2003. Fundamentos y técnicas de análisis microbiológicos. Bacilos Gram Positivos; *Listeria Monocytogenes*. Laboratorio de Diagnóstico Clínico. Consultada: <http://chopo.pntic.mec.es/~gdiaz3/apuntes/UT126.pdf>
11. FIGUEROA, B.; CABALLERO, A.; VILLALOBOS, L. 2005. Crecimiento de *Listeria monocytogenes* en atún ahumado empacado al vacío. Rev. Zootecnia Trop. online. abr. 2005, vol.23, no.2 págs. 171-181.

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

12. FOOD AND DRUGS ADMINISTRATION. FDA. (US FDA/CFSAN). 2005. Seguridad alimentaria para futuras mamás; Prevención de la listeriosis; Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/~pregnant/spwhilli.html>.
13. FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE (FSIS). 2004. Assessing the Effectiveness of the *Listeria monocytogenes* Interim Final Rule. Washington D. C.
14. HYDRA-SPONGE WITH BUFFERED PEPTONE (3M), 2008. Water Broth HS10BPW. Hydrated sponge 10mL Buffered Peptone Water Broth, 100/case.
15. INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF), 2002. Microorganismos de los Alimentos. Análisis Microbiológico en la Gestión de la Seguridad Alimentaria. Editorial Acribia S. A., Zaragoza, España. Págs. 209-316.
16. KENNETH, R; GEORGE. R. 2005. Sherris. Microbiología Médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. Capítulo 18. McGraw Hill. México. Págs.: 328-331.
17. KONEMAN, E.W.; WASHINGTON C. W.; STEPHEN D. A. WILLIAM M. J.; PAUL C.; SCHRECKENBERGER, G. PROCOP, W.; WOODS G. 2005. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Chapter 5, Edition 6. Lippincott Williams & Wilkins, United States. 1565 páginas.
18. LENNETTE, E.; BALOWS, A.; HAUSLER, W.; SHADOMY, J.; 1985. Manual of Clinical Microbiology. Fourth edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C. Págs. 205-208.
19. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; y PARKER, J. 2004. Brock. Biología de los Microorganismos, Capítulo 29, 10ª edición. Pearson Educacion, S.A., Madrid, pags. 953-954.



20. MÁRQUEZ, J. G.; GARCÍA, C. E. 2007. Microflora Patógena Del Queso Blanco " Telita" Elaborado en Cuatro Estados de Venezuela. *An Venez Nutr. online.*, vol.20, no.1 p.17-21.
21. MARTINO, T. Y COL. 2005. Determinación de *Listeria* spp. en quesos y embutidos comercializados en Cuba. *Rev. Cubana Salud Pública* 2005; 31 (3): 217-22.
22. MORENO, R. I; GARCÍA, A.; GONZÁLEZ, H.; ACEDO, F.; DÍAZ, M. 2005. Caracterización de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas durante la cadena de producción y comercialización de queso fresco.  
  
Disponible en: <http://www.ciad.mx/boletin/novdic05/monocytogenes.pdf>
23. OTTAVIANI & AGOSTI 2008. Agar *Listeria Monocytogenes* Selectivo acc. Guía de uso. Biokar Diagnostics, 2007.
24. PELISSER, M.; MENDEZ, S.; SUTHERLAND, A.; BATISTA, C. 2001. Detection of *Listeria* spp. In refrigerated chicken carcasses using clearview and a modified conventional culture method. *Rev. Brazilian Journal of Microbiology*. Vol: 32:113-116. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v32n2/a08v32n2.pdf>
25. RODRÍGUEZ, J. 2001. *Listeria monocytogenes*, el patógeno alimentario del futuro inmediato. *Revista Consumer Eroski*. Disponible en: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2001/08/09/347.php>
26. UNIVERSIDAD NACIONAL DE PANAMÁ 1998. Guía metodológica trabajo de graduación. Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología. Escuela de Biología.

Recibido: 19/09/12; aceptado: 12/11/12

Se autoriza la reproducción total o parcial de este artículo, siempre y cuando se cite la fuente completa y su dirección electrónica.

<http://www.revistacentros.com>

27. U.S FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA. 2003. Detección y enumeración de *Listeria Monocytogenes en alimentos*. Bacteriological Analytical Manual online. Enero de 2003. Disponible en:  
[http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es/2.10.14\\_Listeria\\_monocytogene](http://www.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.10.14_Listeria_monocytogene)
28. US DEPARTMENT HEALTH and HUMAN SERVICES /FDA/CFSAN and USDA/FSIS. 2008. Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. Disponible en:  
<http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html>.
29. VERA H.; FERRO, C. TRIANA, L. 2001. Prevalencia de *Listeria monocytogenes* en derivados cárnicos cocidos para consumo directo. Analizados en el Laboratorio de Salud Pública, de la Secretaria Distrital de Salud; Colombia. Disponible en:  
<http://chopo.pntic.mec.es/~gdiaz3/apuntes/UT126.pdf>