

## FRECUENCIA DE *Listeria* spp., EN QUESOS COLOMBIANOS COSTEÑOS

### FREQUENCY OF *Listeria* spp. IN COASTAL COLOMBIAN CHEESES

Janneth Gallegos<sup>1,4</sup>, M.Sc, Germán Arrieta<sup>2</sup>, Microb, Salim Máttar<sup>2</sup>, Ph.D, Raúl Poutou<sup>3\*</sup>, Ph.D, Alba Trespalcacios<sup>5</sup>, M.Sc, Ana Carrascal<sup>4</sup>, M.Sc.

<sup>1</sup>Escuela de Bioquímica y Farmacia. Facultad de Ciencias. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba. Ecuador. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia. <sup>3</sup>Laboratorio de Biotecnología Aplicada, <sup>4</sup>Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial, <sup>5</sup>Laboratorio de Bacteriología Especial. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, D.C. Colombia.

Recibido: Agosto 23 de 2007; Aceptado: Noviembre 12 de 2007

## RESUMEN

**Objetivo.** Determinar la frecuencia de *Listeria* spp., en quesos frescos costeños, distribuidos en plazas de mercado populares de las ciudades de Montería y Cereté. **Materiales y métodos.** Teniendo en cuenta la importancia económica de esta zona ganadera para Colombia se tomaron 217 muestras entre Junio y Agosto de 2005, los aislamientos obtenidos fueron identificados por pruebas bioquímicas presuntivas, PCR-Múltiple (L1-U1/LF-LR) y pruebas bioquímicas para confirmación de especie. Adicionalmente, se determinó la frecuencia de las especies del género y se caracterizó la resistencia antimicrobiana de las cepas de mayor frecuencia. **Resultados.** Las pruebas bioquímicas y la PCR detectaron 49 aislamientos positivos para *Listeria* (22.58%), de los cuales 16.33% (8/49) correspondieron a Montería y 24.40% (41/168) a Cereté. La frecuencia por especies fue 14.75% para *L. ivanovii*, 2.30% para *L. innocua*, 1.84% para *L. welshimeri* y 1.38% para *L. seeligeri*, no se detectó *L. monocytogenes*. Sólo 3/32 cepas de *L. ivanovii* (9.38%) mostraron resistencia a penicilina, estreptomina y eritromicina respectivamente. **Conclusiones.** Los resultados confirman que los quesos costeños están frecuentemente contaminados con *Listeria* spp. La presencia de *L. ivanovii* patógeno involucrado en algunos casos de infecciones oportunistas en humanos y *L. innocua*; microorganismo utilizado en muchas industrias de alimento como indicador del grado o calidad de sanitización; demuestra que las condiciones de producción y expendio no son adecuadas y que el consumo de queso costeño no es seguro. La resistencia antimicrobiana aunque baja muestra posibilidades para la transmisión horizontal y/o vertical de los genes de resistencia.

**Palabras clave:** *Listeria*, frecuencia, quesos, Córdoba.

## ABSTRACT

**Objective.** To determine the frequency of *Listeria* spp., in coastal fresh cheeses, distributed in popular market places of Montería and Cereté cities. **Materials and methods.** Keeping in mind the economic importance of this cattle area for Colombia, 217 samples were collected between June and August of 2005, the obtained isolations were identified by presumptive biochemical tests, multiple-PCR-(L1-U1/LF-LR) and biochemical tests for species confirmation. Additionally the frequency of gender species was determined and the antimicrobial resistance of more frequency strains was characterized. **Results.** Biochemical tests and PCR detected 49 positive isolations for *Listeria* (22.58%), of which 16.33% (8/49) corresponded to Montería and 24.40% (41/168) to Cereté. Frequency for species was 14.75% for *L. ivanovii*, 2.30% for *L. innocua*, 1.84% for *L. welshimeri* and 1.38% for *L. seeligeri*, *L. monocytogenes* was not detected. Only 3/32 stumps of *L. ivanovii* (9.38%) showed resistance to penicillin, streptomycin and erythromycin respectively. **Conclusions.** The results confirm that the coastal cheeses are frequently contaminated with *Listeria* spp. The presence of *L. ivanovii* pathogen involved in some cases by opportunist infections in human and *L. innocua* microorganism used in many food industries as indicator of the grade or sanitization quality; demonstrates that the production conditions and marketing are not good and that the consumption of coastal cheese is not safe. The antimicrobial resistance although lower shows possibilities for the horizontal and/or vertical transmission of resistance genes.

**Key words:** *Listeria*, frequency, cheeses, Córdoba.

## INTRODUCCIÓN

El género *Listeria* está formado por seis especies diferentes: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. grayi*. Sólo dos especies, *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son patógenas y aunque presentan diferencias en la patogenicidad el ciclo de vida como parásito intracelular es muy parecido. *L. monocytogenes* causa enfermedad severa en humanos y en animales, mientras que *L. ivanovii* se ha visto más asociada a infecciones en animales (1).

En humanos *L. monocytogenes* produce una enfermedad invasiva que puede afectar el Sistema Nervioso Central (SNC) y conducir a la muerte, o dejar secuelas neurológicas; la forma no invasiva de la enfermedad ocasiona síndrome gastrointestinal. Aunque la listeriosis puede manifestarse en personas aparentemente saludables, existen grupos especialmente sensibles como los

neonatos, las mujeres embarazadas, los ancianos y personas inmunosuprimidas en general (1). La tasa de mortalidad de esta enfermedad oscila entre 20 y 30% (2). Las formas clínicas de la enfermedad varían de acuerdo al grupo infectado y las manifestaciones más comunes son meningitis, meningoencefalitis, septicemia, aborto, infección prenatal y gastroenteritis. Se cree que el 99% de los casos de listeriosis son de origen alimentario, el resto obedece a infección de recién nacidos a través de la madre infectada o por contagio en las salas de neonatos. En brotes esporádicos y epidemias una gran variedad de alimentos han aparecido como vehículos; entre ellos la leche, el queso, la mantequilla, el paté, la carne de res, la carne de cerdo, las aves, los vegetales, los productos del mar y particularmente los productos listos para consumo rápido (3).

Varias especies animales pueden ser infectadas por *L. monocytogenes*, la

mayoría de casos de enfermedad ocurre en rumiantes, con menor frecuencia en cerdos y las aves por lo general actúan como portadores sanos. En general las infecciones en animales son subclínicas pero la listeriosis puede producirse esporádicamente o en forma epidémica, lo que representa un gran impacto económico. Adicionalmente la listeriosis en animales, evidencia el papel de estos como fuente de infección humana (zoonosis), debido al contacto directo del humano con los animales infectados, durante el parto de vacas u ovejas o al consumo posterior de productos alimenticios contaminados de origen animal (4).

*L. ivanovii* posee un tropismo diferencial específico hacia los rumiantes, en especial especies menores, en las que provoca abortos septicemia enteritis, a diferencia de la encefalitis que es la forma clínica típica de rumiantes infectados por *L. monocytogenes*, mientras que *L. ivanovii* tiene como órgano blanco el útero grávido (5).

En la literatura se han encontrado pocos casos de infecciones humanas por *L. ivanovii* desde el primer aislamiento de este microorganismo en Bulgaria en 1955 (6). Han existido casos de listeriosis en pacientes con SIDA en los que se ha detectado *L. ivanovii* (7), también se ha detectado el microorganismo en placenta post-parto (8) entre otros (1).

Sin embargo, la importancia relativa de la transmisión zoonótica de la enfermedad aún no es clara y pareciera ser más relevante para la salud pública y la contaminación de los alimentos. La ubicuidad de *Listeria spp.*, le permite la entrada a los ambientes de procesamiento y en la cadena alimentaria. A estos factores se suma, la capacidad de la bacteria para crecer a temperaturas de refrigeración lo cual incrementa el riesgo de contaminación de los alimentos.

En la elaboración de lácteos factores como las prácticas de ordeño, las condiciones de la infraestructura, la higiene en las salas y equipos de la granja, pueden contribuir a la presencia de *Listeria spp.*, en la leche y sus derivados; no obstante a que se pueden aplicar tratamientos como la pasteurización de la leche para destruir las cepas circulantes de *Listeria spp.*, es posible que la contaminación ocurra post-proceso. Varios métodos de detección de *Listeria spp.*, han demostrado que la contaminación del producto final proviene a menudo del ambiente, incluyendo suelo, paja o materia fecal (9).

La contaminación humana con cepas patógenas de *Listeria spp.*, puede ocurrir a través del consumo de leche cruda, derivados o por la ingestión de alimentos procesados contaminados post-proceso (1).

En Colombia desde 1992 se han reportado algunos casos de infección por *L. monocytogenes* y un índice de mortalidad del 26% aunque en la actualidad se habla de subregistros. El factor más alarmante de la listeriosis no es la incidencia, sino la tasa de hospitalización (90%) que supera a la mayoría de los patógenos implicados en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), y sobre todo la tasa de mortalidad en humanos (20 - 30%); la situación para los animales es muy similar, pese a que han establecido tratamientos apropiados con antimicrobianos en ambos casos (1).

Los quesos son considerados los productos contaminados con mayor frecuencia, se incluye además el ensilado destinado a consumo animal (4). En Colombia, el queso, debido a su composición, nutrientes, valores de actividad de agua, pH, está reconocido como un alimento de alto riesgo en salud pública y al igual que en otros países

del mundo se ha visto asociados a casos de abortos en mujeres embarazadas y meningitis infantil (1). En este sentido, los análisis microbiológicos de este tipo de alimento han reportado prevalencias para *L. monocytogenes* de 78.3%, 15% y 29.6% y el 33,1% en Antioquia (1). Sin embargo, hasta el momento no se han publicado datos sobre prevalencia de *Listeria* spp., en quesos de otras regiones del país.

Desde el punto de vista agropecuario, la listeriosis genera incrementos en los costos de producción animal, debido a la enfermedad, al aumento de la infertilidad y a las tasas de aborto; sin embargo estos aspectos son secundarios, ya que el problema de fondo está asociado con la seguridad alimentaria antes que con las pérdidas económicas generadas, lo que no significa que estas no sean de gran importancia. En todo caso, la ubicuidad de *Listeria* spp., la tolerancia a condiciones extremas, la proporción alta de portadores humanos asintomáticos (6%), las cepas persistentes en ambientes de elaboración de alimentos hacen más difícil la posibilidad real de eliminar *Listeria* spp., de la cadena alimentaria (10).

En el departamento de Córdoba, zona ganadera por excelencia en Colombia, se estima que el 70% del total de la producción lechera se destina a la elaboración de queso, para lo cual se emplean muchos sistemas artesanales como industriales (9). La fabricación no estandarizada de quesos constituye un renglón importante en la economía de muchos pobladores de la zona; siendo un producto de consumo masivo.

El presente estudio estuvo encaminado a determinar la ocurrencia de *Listeria* spp., en quesos frescos costeños expendidos en las plazas de mercado de los municipios de Montería y Cereté.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tipo y lugar de estudio.** El presente estudio fue de tipo descriptivo y se realizó en los laboratorios del Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico, Universidad de Córdoba, Montería y en el Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá D.C.

**Muestras empleadas.** Un total de 217 muestras de queso tipo costeño de producción artesanal fueron recolectadas aplicando muestreo no probabilístico entre Junio y Agosto de 2005 en las plazas de mercado de los Municipios de Montería y Cereté en el Departamento de Córdoba, Colombia. Las muestras fueron analizadas para detectar la presencia de *Listeria* spp., se tomaron quesos con pesos entre 100 y 200g en las condiciones normales de venta al público y se transportaron refrigeradas al laboratorio, donde fueron procesadas dentro de las 12h siguientes. Se utilizó la técnica recomendada por la FDA (11) para productos lácteos con dos enriquecimientos sucesivos.

**Métodos microbiológicos.** De cada muestra de queso se tomaron 25g incluyendo las superficies y parte central. Las muestras se mezclaron por agitación manual durante 2min con 225ml de caldo de enriquecimiento listeria (Oxoid Limited, Basingstone, Hampshire, England) y se incubaron a 30°C durante 4h. Luego se adicionó el agente selectivo SRO (Oxoid Limited, Basingstone, Hampshire, England) (50mg/l cicloheximida, 15mg/l clorhidrato de acriflavina, 40mg/l ácido nalidíxico) y se continuo la incubación por 48h; las muestras sin crecimiento evidente fueron incubadas 168h. A las 24h del cultivo anterior, se tomaron 5ml y fueron inoculados en 50ml de caldo de enriquecimiento listeria y se incubaron

nuevamente a 30°C por 24h (primer sub-enriquecimiento). Al término de este tiempo se transfirieron 100µl de cultivo a 10ml de un nuevo caldo de enriquecimiento y se incubaron a las mismas condiciones por 48h.

#### **Aislamiento en agares selectivos.**

Después de 48h del primer enriquecimiento, se tomaron colonias del cultivo y se subcultivaron en cajas de agar Palcam (Oxoid Limited, Basingstone, Hampshire, England) suplementado con aditivo selectivo 150E (Oxoid Limited, Basingstone, Hampshire, England) (10mg/l polimixina B, 20mg/l ceftazidima) y agar Oxford (Oxoid Limited, Basingstone, Hampshire, England) suplementado con aditivo selectivo SR0 140E (Oxoid Limited, Basingstone, Hampshire, England) (400mg/l cicloheximida, 20mg/l sulfato de colistina, 5mg/l acriflavina, 2mg/l cefotetan, 10mg/l fosfomicina) y se incubaron a 36°C ± 2 por 48h. De los cultivos correspondientes al primer sub-enriquecimiento se subcultivaron en cajas con agar Palcam, y del segundo sub-enriquecimiento en agar Oxford a 36°C ± 2 por 48h.

#### **Examen presuntivo para *Listeria* spp.**

De los cultivos en agares selectivos se seleccionaron colonias con morfología macroscópica, típica del género (Tabla 1), se sembraron por agotamiento en agar TSYE (Oxoid Limited, Basingstone, Hampshire, England) y se incubaron a 36°C ± 2 por 24h; las colonias se observaron por el método de iluminación de Henry (12). Las colonias presuntivas para *Listeria* spp., se examinaron por Gram, actividad catalasa, hemólisis y micro-hemólisis en agar sangre de cordero al 5% (v/v) (13), pruebas bioquímicas (TSI/H<sub>2</sub>S, citrato, urea, rojo de metilo, Voges-Proskauer, movilidad a 25°C y producción de indol). Los aislamientos presuntivos de *Listeria* spp., fueron confirmados por PCR. Para evidenciar la actividad hemolítica, se

inocularon por picadura placas de agar sangre de ovino al 5% (v/v) con los aislamientos puros sembrados en TSYE, se incubaron a 37°C durante 24 horas, los resultados se registraron de acuerdo a la escala propuesta por Domínguez et al +++++ hemólisis fuerte, +++ y ++ hemólisis moderada, + hemólisis débil, ± hemólisis cuestionable, - negativa (13).

#### **Cuantificación de la actividad hemolítica.**

Los aislamientos fueron cultivados en caldo BHI durante 18h a 37°C, 100µl de cultivo se depositaron en el primer pozo de una placa de microhemólisis, en los pozos consecutivos se adicionó 50µl de solución salina (0.85% (p/v) NaCl), a partir del primer pozo se prepararon diluciones en proporciones 1:2. A cada dilución bacteriana se adicionó 100µl de una suspensión al 3% (v/v) de eritrocitos humanos previamente lavados con una solución compuesta por 0.85% (p/v) de NaCl, 0.01% (p/v) de gelatina y 0.43% (p/v) de NaN<sub>3</sub>. La microplaca fue incubada a 37°C durante 4h; como control negativo se empleó *L. innocua*. Las microplacas se leyeron visualmente y el título de la actividad hemolítica se expresó en unidades completas de hemólisis (UCH) calculadas como el inverso de la dilución más alta a la cual tuvo lugar el 100% de la hemólisis y las unidades mínimas de hemólisis (UMH) fueron calculadas como el recíproco de la dilución más alta a la cual se detectó la hemólisis (13).

#### **Extracción de ADN cromosomal.**

Para la extracción de ADN, las cepas presuntivas de *Listeria* spp., fueron cultivadas en caldo BHI durante 12h a 37°C y 250 r.p.m. Un mililitro de cultivo fue centrifugado por 10 min a 2000g; una vez obtenidas las células, se lavaron con tampón TE 1X (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0 ± 0.2). Para la lisis celular, el "pellet" resultante fue resuspendido en 200µl de tampón TE 1X más 2mg/ml

**Tabla 1.** Aislamiento de cepas presuntivas de *Listeria* spp., en quesos frescos costeños en los municipios de Montería y Cereté.

Identificación Bioquímica y PCR	Origen	Código interno	Movilidad en Sombrill a 25°C	Catalasa	Resistencia Antimicrobiana Ant. Conc. (mm Halo/Punto de Corte)	Act. Microhemolítica	
						UCH	UMH
<i>L. ivanovii</i>		QC1		Negativa		12	32
		QC2	Positiva	Negativa		12	
		QC3	Positiva	Negativa		12	32
		QC4	Positiva	Negativa		12	32
		QC5	Positiva	Negativa		12	32
<i>L. welshimeri</i>		QC6		Positiva			
<i>L. ivanovii</i>		QC7	Positiva	Negativa		12	32
<i>L. welshimeri</i>		QC8		Positiva			
<i>L. ivanovii</i>	Cereté	QC9	Positiva	Negativa		12	32
		QC10	Positiva	Negativa		12	32
		QC11	Positiva	Negativa		12	
		QC12	Positiva	Positiva	S 10µg (10/11 )	12	16
<i>L. innocua</i>		QC13	Positiva	Positiva			
<i>L. welshimeri</i>		QC15		Positiva			
<i>L. innocua</i>		QC16	Positiva	Positiva			
<i>L. ivanovii</i>		QC17	Positiva	Negativa		16	32
		QC18		Negativa		16	
<i>L. innocua</i>		QC19	Positiva	Positiva			
		QC20	Positiva	Positiva			
<i>L. innocua</i>		QC22	Positiva	Positiva			
<i>L. ivanovii</i>		QC23	Positiva	Negativa		16	32
		QC24	Positiva	Negativa		16	
		QC25	Positiva	Negativa		16	
<i>L. ivanovii</i>		QC27	Positiva	Negativa	P 10U (16/19)	8	
		QC28	Positiva	Positiva		8	
		QC29	Positiva	Negativa		16	32
		QM1	Positiva	Negativa		16	
<i>L. ivanovii</i>	Montería	QM3	Positiva	Negativa		16	32
		QM4	Positiva	Negativa		16	32
		QM5		Positiva			
<i>L. welshimeri</i>							
<i>L. ivanovii</i>		QM6	Positiva	Negativa	E 15µg (-/12 )	16	32
		QC30	Positiva	Negativa		16	32
		QC31	Positiva	Negativa		16	32
<i>L. seeligeri</i>		QC32		Positiva		16	
<i>L. ivanovii</i>		QC33	Positiva	Negativa		16	32
		QC34	Positiva	Negativa		16	32
<i>L. seeligeri</i>	Cereté	QC35	Positiva	Positiva		16	
		QC36	Positiva	Negativa		16	

UCH: unidades completas de hemólisis, UMH: unidades mínimas de hemólisis; S: estreptomycin, P: penicilina, E: eritromicina, \*: Resistencia antimicrobiana calculada según los puntos de corte para cepas de origen clínico.

de lisozima y se incubó durante 30' a 37°C. Posteriormente para lograr la degradación de las proteínas se añadieron 300µl de tampón TE1X más 1% (p/v) de SDS y proteinasa K a concentración final de 100µg/ml, la mezcla se incubó a 65°C por 1h. Para eliminar los péptidos y lípidos residuales se adicionaron 84µl de una solución 5M de NaCl más 60µl de CTAB (10% (p/v) disuelto en 0.7M de NaCl) y se incubó nuevamente durante 20min a 65°C. La suspensión resultante se trató con una mezcla 24:1 de fenol-cloroformo. Una vez separadas las fases por centrifugación, la fase acuosa se trató con isopropanol (2-propanol) para lograr la precipitación del ADN. El ADN precipitado se lavó con etanol al 70% (v/v), fue secado a 37°C y resuspendido en tampón TE 1X. Para la determinación de la pureza y concentración de los ADNs obtenidos se empleó un espectrofotómetro Biospec 1601 Shimadzu. Las mediciones se realizaron a 260 y 280nm con corrección de fondo a 320nm (14).

**Confirmación del género *Listeria* y la especie *monocytogenes* por PCR.** Para la reacción de PCR se emplearon los iniciadores L1 (CTCCATAAAGGTGACCCT), U1 (CAGCMGCCGCGGTAATWC), LF (CAAACGTTAACAACGCAGTA) y LR (TCCAGAGTGATCGATGTTAA). El volumen final de la reacción fue 35ml, conteniendo tampón de PCR 1X, 2.5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM de cada dNTP, 20pmol de cada iniciador y 2U de TaqADNpol (Promega), más 5ml de ADN o muestra (~120ng de ADN). Se empleó un termociclador Gene Cycler™ (BioRad), programado de la siguiente manera: 1min a 95°C, seguidos de 40 ciclos compuestos por 30s a 94°C, 20s a 51°C, 30s a 74°C y un paso final de extensión de 8min a 74°C. Como control en la PCR se empleó el ADN purificado de las cepas L5 (*L. innocua*) y L8 (*L. monocytogenes*) (14).

**Electroforesis de ADN.** Los ADNs

obtenidos en las extracciones y los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón TAE 1X (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA pH 8 ± 0.2), teñidos con 0.3µg/ml de bromuro de etidio, separado a 120V durante 1h y fotografiados bajo luz ultravioleta. Como marcador de talla molecular se empleó el 100bp Ladder (Promega) (14). Los aislamientos que por PCR resultaron diferentes a *L. monocytogenes*, fueron sometidos a identificación bioquímica por el sistema API-Listeria, (BioMerieux) y/o fermentación de azúcares (ramnosa, xilosa y manitol).

**Susceptibilidad antimicrobiana.** Las cepas de mayor ocurrencia fueron empleadas para analizar la susceptibilidad antimicrobiana por ser un importante patógeno del ganado vacuno. Las cepas desde su aislamiento estuvieron conservadas en glicerol al 10% (p/v) y congeladas a -70°C. Las cepas fueron revitalizadas en agar TSYE (Oxoid Limited, Basingstone, Hampshire, England), los cultivos se incubaron a 30°C durante las 24h previas al ensayo. Para determinar la susceptibilidad a antibióticos se aplicó la técnica de Kirby- Bauer (15). De tres a cinco colonias aisladas en TSYE se inocularon en 5ml de Caldo infusión cerebro corazón, BHI (Sharlau), se incubó a 37°C por 24 horas, se diluyó 1:10 en agua de peptona al 0.1% (p/v) hasta obtener una suspensión equivalente al estándar 0.5 Mac Farland. Se sembró en agar Muller-Hinton y en agar sangre desfibrinada de cordero al 5% (v/v), luego se distribuyeron los discos antibióticos (Oxoid Limited, Basingstone, Hampshire, England) conteniendo 10µg de ampilicina (A10), 30µg de cloranfenicol (C30), 15µg de eritromicina (E15), 10µg de gentamicina (CN10), 10 unidades de penicilina G (P10), 10µg de streptomycin (S10), 30µg de vancomicina (VA30). Después de incubarse por 24h a 37°C, se midió el diámetro en mm de la zona de inhibición alrededor de

cada disco y se interpretó de acuerdo con la metodología propuesta por Vela, et al (16).

## RESULTADOS

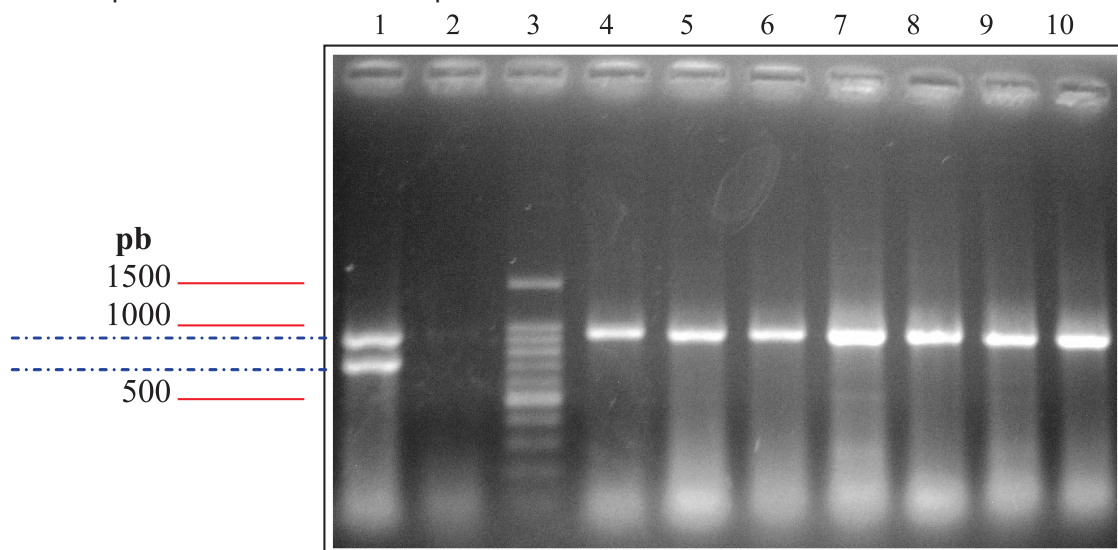
De las 217 muestras tomadas, 49 (22.58%) correspondieron al municipio de Montería y 168 (77.42%) al municipio de Cereté. El análisis convencional para la identificación de *Listeria* spp., en estas muestras arrojó una frecuencia del 22.58% (49/217) para el género. En los quesos provenientes de Montería la proporción de *Listeria* spp., fue 16.33% (8/49) y en los quesos de Cereté fue 24.40% (41/168). Las 49 cepas identificadas como *Listeria* spp., por morfología y pruebas bioquímicas presuntivas fueron analizadas por PCR, con lo cual 89.80% (44/49) de las cepas fueron confirmadas como miembros del género y ninguna produjo la amplificación característica de *L. monocytogenes* (Figura 1).

*Listeria* y pruebas bioquímicas convencionales, para lograr la discriminación en especies; los resultados arrojaron (0/49) cepas de *L. monocytogenes*, (32/49) cepas de *L. ivanovii*, (5/49) cepas de *L. innocua*, (4/49) de *L. welshimeri*, (3/49) cepas de *L. welshimeri/seeligeri*, y (5/49) cepas cuya respuesta atípica a la fermentación de azúcares coincidió con la respuesta atípica en la PCR con la amplificación de la banda de 750pb (Tabla 1, Figura 2).

La frecuencia general mostró para *L. ivanovii* 14.75% (32/217), *L. innocua* con 2.30% (5/217) y *L. welshimeri* con 1.84% (4/217). El resto de los aislamientos no fueron identificados como miembros del género (79.72%), (173/217), o su identificación bioquímica fue dudosa (1.38%), (3/217). En este último grupo se identificó por microhemólisis (16UCH) *L. seeligeri*. La distribución de las diferentes especies se muestra en la figura 2.

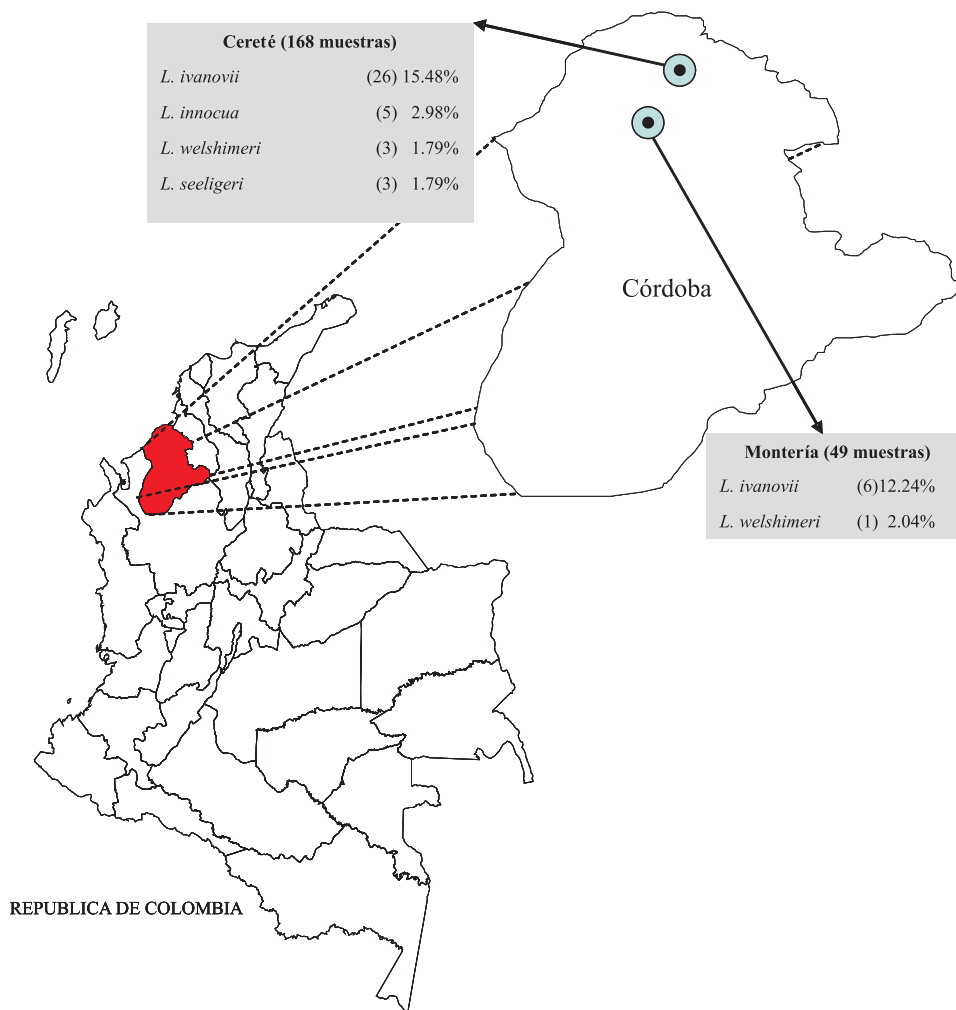
Las 49 cepas fueron analizadas por API-

El 100% de las cepas de *Listeria* spp.,



**Figura 1.** Electroforesis en gel de agarosa 1% (p/v) en tampón TAE 1X. Reacciones de PCR para la identificación del género *Listeria*, especie *monocytogenes*: carril 1. Cepa Control (L6) de *Listeria monocytogenes* ATCC 4640, carril 2. Blanco de la Reacción de PCR, carril 3. Marcador de Talla Molecular 100bp Ladder (Promega), carril 4. Cepa control (L5) de *Listeria innocua* (Suiza), carril 5. QC8, carril 6. QC19, carril 7. QC36, carril 8. QM7, carril 9. QM1, carril 10. QM6.





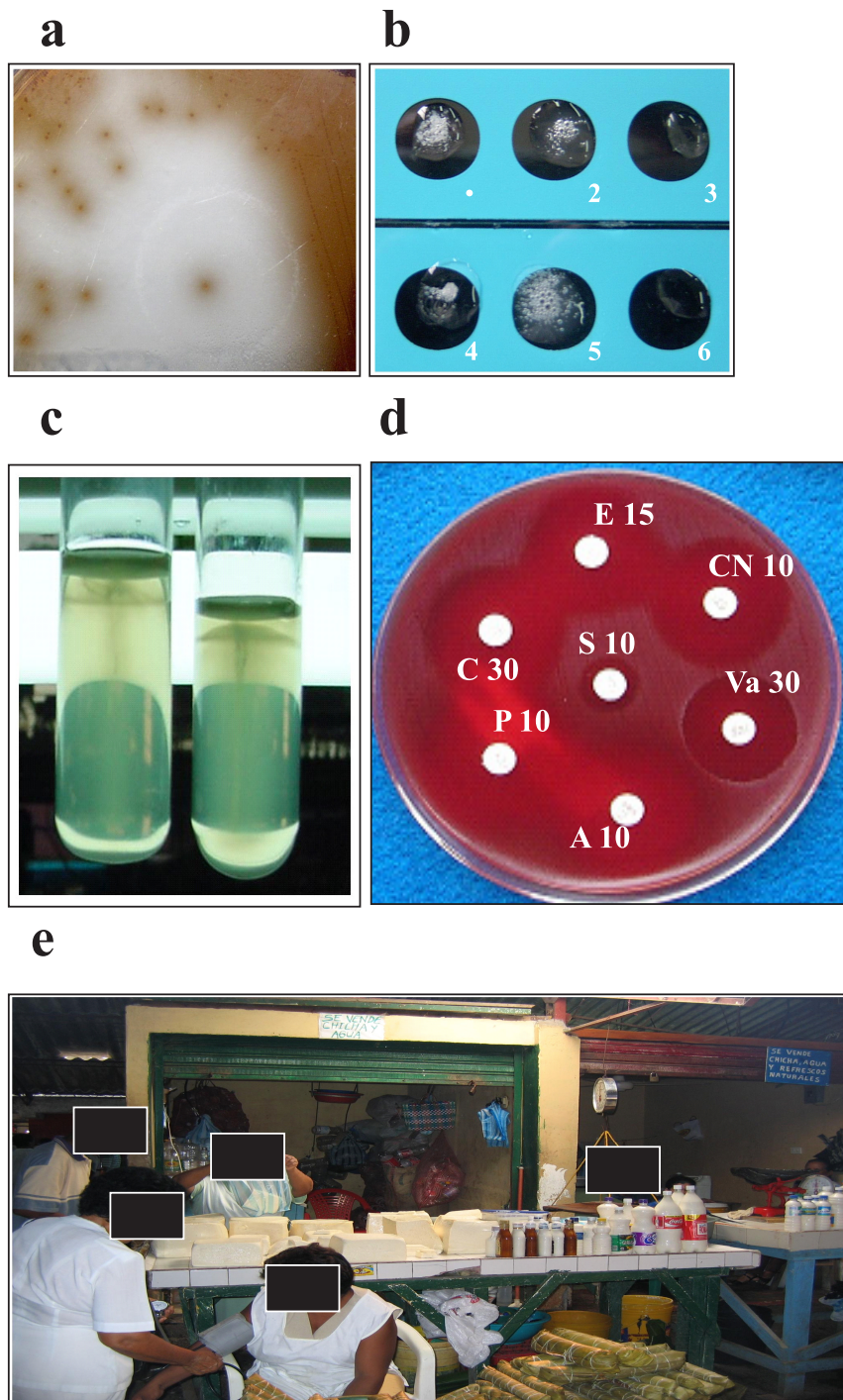
**Figura 2.** Especies de *Listeria* aisladas en quesos costeños de los municipios de Montería y Cereté, departamento de Córdoba, Colombia.

aisladas (49/49) hidrolizaron la esculina, el 38.78% de los aislamientos fueron catalasa positiva, el 61.22% (30/49) fueron catalasa negativa. Respecto a la movilidad a 25°C, algunas cepas 14/49 (28.57%), fueron móviles, sin embargo no se observó en estas la formación típica de sombrilla (Figura 3a, b y c).

La actividad hemolítica de *L. ivanovii* se calificó entre débil (+) y dudosa ( $\pm$ ). En la determinación cuantitativa *L. ivanovii* presentó microhemólisis con valores que oscilaron entre 8 y 16UCH y entre 16 y 32UMH, 2 cepas evidenciaron 8UCH, mientras la mayoría de cepas presentó

16UCH, entre estas últimas, una cepa mostró 16UMH, otras 18 presentaron 32UCH y 13 no mostraron UMH (Tabla 1).

Al comparar los puntos de corte en el análisis de la resistencia antimicrobiana de las cepas de *L. ivanovii*, se encontró que la mayoría de las cepas 29/32 (90.6%) fueron sensibles a todos los antibióticos ensayados y sólo 3/32 (9.4%) presentaron resistencia a penicilina 10U (QC27), eritromicina 15 $\mu$ g (QM6), y estreptomina 10 $\mu$ g (QC12) (Figura 3d). No se encontró ningún caso de multiresistencia (Tabla 1).



**Figura 3.** a: Caja de agar Oxford, donde se aprecian colonias del aislamiento QM3 produciendo la hidrólisis de la esculina; b: Prueba de catalasa (b1: aislamiento QC6 catalasa positiva, b2: aislamiento QC12 catalasa positiva, b3: aislamiento QM3 catalasa negativa, b4: aislamiento QM2 catalasa positiva, b5: aislamiento QM5 catalasa positiva, b6: aislamiento QM5 sin adición de  $H_2O_2$ ); c: Prueba de movilidad en medio SIM mostrando la movilidad en forma de sombrilla (c1: aislamiento QC17, c2: aislamiento QM4); d: Prueba de susceptibilidad antimicrobiana. Técnica de Kirby-Bauer en agar sangre de cordero al 5% muestra la resistencia del aislamiento QC12 a estreptomycin 10 $\mu$ g (S10) y la sensibilidad frente a penicilina (P10U), eritromicina (E15 $\mu$ g), ampicilina (A10 $\mu$ g), vancomicina (Va30 $\mu$ g), cloranfenicol (C30 $\mu$ g) y gentamicina (CN 10 $\mu$ g) y e: Proceso artesanal de la fabricación y venta del queso costeño.

## DISCUSIÓN

La listeriosis es una enfermedad de transmisión alimentaria y se ha demostrado que los alimentos listos para consumo han estado frecuentemente involucrados en la transmisión de la enfermedad. En este tipo de alimentos las condiciones inadecuadas de procesamiento, el manejo post proceso y el almacenamiento pueden favorecer el desarrollo de *Listeria* spp (1).

En el departamento de Córdoba, se ha estimado una producción diaria de 1'060.510 litros de leche y aproximadamente el 70% de este volumen se destina a la elaboración de queso costeño debido a que la alta concentración de sal del mismo favorece la conservación en climas cálidos (17). En estos procesos de fabricación artesanales por lo general no se emplea leche pasteurizada.

Durante el muestreo realizado en Montería y Cereté se pudo constatar el modo artesanal de elaboración del queso costeño y las condiciones antihigiénicas de en los sitios de expendio en las plazas de mercado. Estas condiciones promueven la presencia de patógenos como *Listeria* spp., en el producto (Figura 3e).

Los resultados obtenidos en la PCR revelaron 49 cepas pertenecientes al género *Listeria* con la consecuente amplificación de una banda de 938pb correspondiente a la amplificación del un fragmento del rDNA 16S; la ausencia de la especie *monocytogenes* se demostró con la ausencia de banda de amplificación a los 750pb. Esta banda pudo apreciarse en la cepa de *L. monocytogenes* empleada como control, debido a que los "primers" LF/LR amplifican un fragmento del gen *hlyA* codificante de la listeriolisina O (LLO), comprendido entre los nucleótidos 577 y 1326; región que no presenta homología con la ivanovilisina O (ILO) de

*L. ivanovii* (14). Seleccionadas las cepas de *Listeria* spp., las pruebas bioquímicas demostraron la presencia de *L. ivanovii* (32/49) y otras especies no patogénicas (Figura 2). La ausencia de *L. monocytogenes* en este tipo de queso, coincide con algunos de los resultados reportados por otros grupos de trabajo (18), en los cuales se han aislado especies diferentes a *L. monocytogenes*, corroborando que el crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos, depende en alguna medida de la formulación o composición, del proceso y de las condiciones ambientales (19); factores que ligados determinan los cambios en las características físicas y químicas de la matriz, favoreciendo el desarrollo de ciertos patógenos.

El departamento de Córdoba, se caracteriza por ser una zona productora de animales de abasto donde la leche es considerada un subproducto. No obstante, se debe prestar atención a las condiciones higiénicas del ordeño y la elaboración de queso. En esta región la temperatura ambiente promedio oscila entre 30 y 35°C; lo que puede afectar el desarrollo de *L. monocytogenes* por ser un organismo psicrófilo, a diferencia de la alta frecuencia observada para este patógeno en quesos comercializados en zonas de clima frío (20).

En relación a los quesos tipo costeño es importante considerar la alta concentración de sal que bien sea con fines de preservación o por preferencias sensoriales del consumidor, reduce la cantidad mínima de agua ( $a_w$ ) en el alimento, induciendo el daño bacteriano. En este sentido la selección de un método analítico acorde al tipo de matriz alimentaria, el tamaño y el número de muestras, son factores determinantes que puede influir en el análisis de la distribución de las cepas de *Listeria* spp., (21). En este trabajo se aplicó la metodología descrita por la FDA (Food

and Drug Administration/AOAC BAM 2003). Sin embargo, al observar el alto nivel de contaminantes presentes en el alimento se decidió ensayar dos sub-enriquecimientos para aumentar la sensibilidad en la detección.

En la detección de *Listeria* spp., la fase de pre-enriquecimiento tuvo como finalidad evitar que factores relacionados con el procesamiento pudieran lesionar las células viables en las muestras de queso, la estrategia consistió en un período de incubación de 4 horas, previo a la adición de los agentes inhibidores, para lograr la recuperación de las células lesionadas (22). En este trabajo se aplicó un pre-enriquecimiento y dos sub-enriquecimientos sucesivos para tratar de obtener el mayor número posible de *Listeria* spp.; este doble sub-enriquecimiento permitió la obtención de 20/49 (40.8%) aislamientos a partir del caldo de enriquecimiento, 33/49 (67.3%) aislamientos en el primer sub-enriquecimiento y 48/49 (98%) en el segundo sub-enriquecimiento.

*L. monocytogenes* puede presentarse conjuntamente con microorganismos competidores y otras cepas de *Listeria* spp., esta situación hace más difícil el aislamiento del patógeno por el método convencional, además de ser un procedimiento demorado. Durante el aislamiento, los medios Oxford y Palcam no permitieron distinguir por morfología macroscópica las distintas especies de listeria. Por lo cual se recurrió a una técnica molecular de PCR-múltiple que identifica el género *Listeria* y la especie *monocytogenes* a través de la amplificación de dos fragmentos de 950 y 738pb respectivamente (14). Las especies diferentes de *monocytogenes* fueron identificadas con pruebas fenotípicas y bioquímicas. Los resultados obtenidos mostraron la ausencia de *L. monocytogenes* en congruencia total entre la PCR y la fermentación de azúcares.

En relación a los inhibidores de microorganismos acompañantes se han reportado concentraciones de acriflavina que varían de 10 a 25mg/l y que *L. monocytogenes* se multiplica en concentraciones de hasta 40mg/l, mientras se suprimen los cocos Gram positivos (23). Otros estudios han indicado que *L. monocytogenes* es incapaz de crecer en concentraciones de 15mg/l de acriflavina a diferencia de lo sucedido frente a concentraciones de ácido nalidíxico entre 20 y 40mg/l, donde hubo poco efecto sobre el crecimiento de *Listeria* spp., destacando que a 100mg/l la tasa de crecimiento se redujo para todas las especies (24).

Por otra parte, se sabe que la acriflavina empleada en el agente selectivo SRO puede ligarse a proteínas del alimento, reduciendo hasta en 60% la 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. Valores de pH inferiores a  $5.8 \pm 0.2$ , incrementan la cantidad de 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 microorganismos competidores (24).

En la detección de *Listeria* spp., también se debe tener en cuenta el efecto de los agentes selectivos, las concentraciones indicadas por el fabricante pueden no ser las de uso universal para todo tipo de alimento, posiblemente con diferentes niveles de microorganismos acompañantes, como en los quesos examinados, los cuales pueden presentar contaminación natural con cepas de *Enterococcus* spp., y *Streptococcus* spp., que exhiben tiempos de duplicación menores y por tanto crecen a mayor velocidad.

Se estima que en el caldo de enriquecimiento la concentración de acriflavina utilizada pudo oscilar entre 9 a 15mg/l, dependiendo de su unión o no a proteínas lácteas, el ácido nalidíxico alcanzaría una concentración aproximada de 40mg/l, valores que se encuentran dentro de los niveles recomendados para limitar el desarrollo de microorganismos acompañantes, sin embargo, en todos los procesos de aislamientos se encontraron microorganismos diferentes a *Listeria* spp. Los hongos filamentosos fueron inhibidos eficazmente, no siendo así con las levaduras. A diferencia de lo que se ha encontrado de muestras de carne, donde los interferentes han sido lactobacilos, enterococos y microorganismos Gram negativos incluyendo *Pseudomonas* spp., microorganismos que se desarrollan fácilmente en esta matriz por su naturaleza.

Las diferentes tasas de crecimiento de las cepas de *Listeria* spp., la producción de bacteriocinas y las interacciones con el alimento en la fase de enriquecimiento 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. Yokohama et al (25), identificaron una sustancia con actividad similar a las bacteriocinas producida por *L. innocua* capaz de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*; sin embargo este resultado podría haber estado influenciado por la alta sensibilidad de *L. monocytogenes* a la acriflavina (24, 25). *L. innocua* es la especie filogenéticamente más cercana a *L. monocytogenes*, es de vida libre, con requerimientos atmosféricos menos exigentes que el patógeno intracelular cuya viabilidad puede ser afectada dependiendo de la presión de oxígeno existente en el medio (26).

*L. innocua* comparte el nicho ecológico con *L. monocytogenes* y se ha admitido que *L. innocua* tiene ventaja competitiva frente a *L. monocytogenes* por tener una velocidad específica de crecimiento superior. En la práctica el crecimiento de una especie por encima de la otra se manifiesta como si en la muestra no existieran las especies de menor velocidad de crecimiento (21), lo que genera un problema en el diagnóstico del patógeno y conduce a reportar falsos negativos con consecuencias directas para la salud pública.

La ausencia de *L. monocytogenes* 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 láurico, linoléico y linolénico a pH  $5 \pm 0.2$  son fuertemente bactericidas, provocando la ruptura de la membrana celular. 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 (27).

En relación a los comportamientos diferenciales de algunas cepas en las prueba de catalasa y la movilidad, Rowan ha mencionado la existencia de formas rugosas de *Listeria* spp., estables en subcultivos; estas formas presentan algunos cambios morfológicos y fisiológicos, son negativas en la prueba de Henry, no presentan la movilidad típica (volteretas) y carecen de la enzima N-acetil- $\alpha$ -glucosamidasas (E.C.3.2.1.52) (28).

La hemólisis es una característica diferencial importante entre las especies de listeria y en los aislamientos ambientales, de alimentos o de portadores asintomáticos, resulta difícil apreciarla por tener una actividad hemolítica

relativamente débil. En este trabajo se encontró que *L. ivanovi* fue débilmente hemolítica, para corroborar esta actividad se ensayó un método más sensible, con el cual se obtuvieron valores bajos de microhemólisis. Este comportamiento sugiere que las cepas aisladas expresaron la ivanovii-lisina O (ILO), cuya actividad se manifiesta en un halo de lisis estrecho que rodea la periferia de las colonias y que no son capaces de producir la esfingomielinasa; determinante implicado en la hemólisis típica, amplia y bizonal del patógeno (29).

Los resultados de microhemólisis producidos por las cepas de *L. ivanovi* estuvieron en los rangos de 0 a 96 UCH y de 12 a 384 UMH, lo cual coincide con resultados observados con cepas virulentas de *L. monocytogenes*, revelando similitud en el comportamiento de cepas de origen diferente frente a la misma prueba (30).

La resistencia antimicrobiana de *L. ivanovii* fue baja; igualmente Gellin y Broome (31) señalaron como rara la resistencia antimicrobiana en este género. La resistencia a penicilina coincidió con los reportes de Charpentier y Courvalin (32) que mencionan aislamientos resistentes en humanos, alimentos y ambientes. También se confirmó que desde el primer reporte de resistencia antimicrobiana en *Listeria* spp., se han aislado cepas resistentes a uno o más antibióticos, a partir del ambiente, de alimentos y de casos clínicos de listeriosis.

La susceptibilidad de *L. ivanovii* a la mayoría de los antimicrobianos ensayados resulta alentadora para la terapéutica en rumiantes, sin embargo, debido al uso indiscriminado de antibióticos y por la transmisión horizontal y vertical de la resistencia antimicrobiana, es de gran importancia monitorear la resistencia de *Listeria* spp.

La presencia de *Listeria* spp., en los quesos puede atribuirse a contaminación durante el procesamiento (33), las bacterias serían transferidas desde las superficies de trabajo o sitios de almacenamiento y a partir de la materia prima o de los locales e instalaciones de las lecherías incluso los operarios pueden ser portadores del microorganismo en la indumentaria, manos y tracto gastrointestinal.

Generalmente se acepta que los quesos no estén libres de *Listeria* spp., debido a los métodos de elaboración, en gran parte artesanales y a la posibilidad de que en el post proceso ocurra contaminación cruzada, a esto se añade un sistema inadecuado de limpieza y desinfección en los sitios de producción (34), sin descartar las deficientes condiciones higiénicas de los sitios de expendio y el manejo inadecuado del alimento en el hogar.

Desde la perspectiva de higiene alimentaria la presencia de *Listeria* spp., en los quesos tipo costeño indica que: *i* el proceso de producción de este alimento propicia la entrada de cepas patogénicas del género listeria, *ii* que estas cepas podrían ser residentes potenciales de los locales de elaboración del alimento; lo que debe alertar acerca del control y la revisión del proceso de producción y las condiciones higiénicas en los sitios de expendio y *iii* la presencia de *L. innocua* es un indicador de procesos deficientes de desinfección y pese a no ser patógena no significa que no pueda estar involucrada en la transmisión de genes de resistencia a antibióticos.

En conclusión, los resultados de este estudio confirman que los quesos costeños producidos en las dos zonas evaluadas, están frecuentemente contaminados por *Listeria* spp. *L. monocytogenes* no se logró detectar pero se encontró *L. ivanovii*; patógeno

de rumiantes que ha sido involucrado en algunos casos de infecciones en humanos. La presencia de *L. innocua*, dado su grado de similitud genética con *L. monocytogenes* es utilizado en muchas industrias de alimento como indicador del grado o calidad de sanitización, lo que muestra que las condiciones de producción y expendio no son las más adecuadas y que el consumo de queso costeño no es seguro.

### Agradecimientos

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Ecuador) por el apoyo a J. Gallegos. Al grupo de investigadores del Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico de la Universidad de Córdoba, por el apoyo logístico al presente estudio. A la Dra. Ivonne Gutiérrez por la revisión crítica de este manuscrito.

### REFERENCIAS

1. Torres KJ, Sierra SC, Poutou RA, Vera H, Carrascal AK, Mercado M. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. Rev UDCA Act Divulg Cient 2004; 7(1): 25-57.
2. Korkeala H, Siitonen A. *Listeria monocytogenes*. Isolates from invasive infections: Variation of sero-and genotypes during an 11 year period in Finland. J Clin Microbiol 2003; 41(4): 1694-1700.
3. Kells J, Gilmour A. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. Int J Food Microbiol 2004; 91: 167-174.
4. Belalcazar ME, Poutou RA, Torres KJ, Gallegos JM, Torres O, Carrascal AK. *Listeria monocytogenes* y listeriosis animal. Rev UDCA Act Divulg Cient 2005; 8(2): 95-101.
5. Vázquez C, Rodas O, Quiñones EI. Occurrence of listeria species in raw milk in farms on the outskirts of Mexico city. Food Microbiol 2001; 18: 177-181.
6. Seeliger HPR, Rocourt J, Schrettenbrunner A, Grimont PAD, Jones D. *Listeria ivanovii* sp. Nov. Int J Syst Bacteriol 1984; 34: 336-337.
7. Cummings AJ, Fielding AK, McLaughlin J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. J Infect 1994; 28: 89-91.
8. Elischerova K, Cupkova E, Urgeova E, Lysy J, Sesevickova A. Isolation of *Listeria ivanovii* in Slovakia. Cesk Epidemiol, Mikrobiol, Inmunol 1990; 39(4): 228-236.
9. Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA. Foodborn pathogens in milk and the dairy farm environment: Food safety and public health implications. Foodborn Path Dis 2005; 2(2): 115-129.
10. Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J Food Protect 2002; 65: 1811-1829.
11. FDA. *Listeria monocytogenes* risk assessment. Questions and answers. FDA News 2003: 4.
12. Hitchins A. Bacteriological analytical manual. 8<sup>th</sup> ed. 2003: Food and Drug Administration/AOAC International. 214-216.

13. Domínguez L, Vázquez-Boland AA, Fernández JF, Echalecu P, Gómez-Lucia E, Rodríguez EF, et al. Microplate technique to determine hemolytic activity for routine typing of listeria strains. *J Clin Microbiol* 1986; 24(1): 99-103.
14. Poutou RA, Burbano ME, Sierra SC, Torres KJ, Carrascal AK, Mercado M. Estandarización de la extracción de ADN y validación de la PCR múltiple para detectar *Listeria monocytogenes* en queso, leche, carne de res y pollo. *Univ Scient* 2005; 10(2): 61-78.
15. Wikler MA, Low DE, Cockerill FR, Sheehan DJ, Craig WA, Tenover FC, et al. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard-ninth edition, in Approved Standard. Document M2-A9. 2006; Clinical and Laboratory Standard Institute (NCCLS): Pensilvania, USA. p.7.
16. Vela AI, Fernández-Garayzábal JF, Latre MV, Rodríguez AA, Domínguez L, Moreno MA. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from meningoencephalitis in sheep. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17: 215-220.
17. Berrocal A, Mejía EM. Evaluación higiénico sanitaria del proceso de elaboración del queso fresco en Montería. Universidad de Córdoba: Montería, Colombia. 2004.
18. Pintado CMBS, Oliveira A, Pampulha ME, Ferreira MASS. Prevalence and characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from soft cheese. *Food Microbiol* 2005; 22: 79-85.
19. Koutsoumanis KP, Sofos JN. Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and  $a_w$  limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 2005; 104: 83-91.
20. Vanegas MC, Rojas IJ, Vergara JP. Detección de *Listeria monocytogenes* de diferentes orígenes. *Mundo Microbiol* 2003; 2(3): 17-20.
21. Gnanou N, Audinet N, Ke'rouanton A, Colin P, Kalmokoff M. Evolution of listeria populations in food samples undergoing enrichment culturing. *Int J Food Microbiol* 2005; 104: 123-134.
22. Asperger H, Heistingner H, Wagner M, Lehner A, Brand E. A contribution of listeria enrichment methodology of growth of *Listeria monocytogenes* under varying conditions concerning enrichment broth composition, cheese matrices and competing microbial flora. *Food Microbiol* 1999; 16: 419-431.
23. MacDonald F, Sutherland AD. Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in two *Listeria* enrichment broths. *J Dairy Sci* 1994; 61: 433-436.
24. Beumer RR, Te Giffel MC, Anthonie SVR, Cox LJ. The effect of acriflavin and nalidixic acid on the growth of *Listeria* spp. in enrichment media. *J Dairy Sci* 1996; 13: 137-148.
25. Yokoyama E, Maruyama S, Katsube Y. Production of bacteriocin-like-substance by *Listeria innocua* against *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol* 1998; 40: 133-137.
26. Jacxsens L, Devlieghere F, Van der Steen C, Debevere J. Effect of high oxygen modified atmosphere packing on microbial growth sensorial qualities of fresh-cut produce. *Int J Food Microbiol* 2001; 71(2): 197-210.



27. Petrone G, Conte MP, Longhi E, Di Santo S, Superti F, Ammendolia MG. Natural milk fatty acids affect survival and invasiveness of *Listeria monocytogenes*. Lett App Microbiol 1998; 27: 362-368.
28. Rowan NJ, Anderson AG, Candlish AAG. Cellular morphology of rough forms of *Listeria monocytogenes* isolated from clinical and food samples. Lett App Microbiol 2000; 31: 319-322.
29. Domínguez G, Müller S, González B, Scotti M, Herrmann P, Monzó HJ, et al. A spontaneous genomic deletion in *Listeria ivanovii* identifies lipi-2, a species-specific pathogenicity island encoding sphingomyelinase and numerous internalins. Mol Microbiol 2006; 59(2): 415-432.
30. Norrung B, Andersen JK. Variations in virulence between different electrophoretic types of *Listeria monocytogenes*. Lett App Microbiol 2000; 30: 228-232.
31. Gellin BG, Broome CV. Listeriosis. The J Amer Med Assoc 1989; 261: 1313-1320.
32. Charpentier E, Courvalin P. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2103-2108.
33. Hof H. History and epidemiology of listeriosis. FEMS Inmunol Med Microbiol 2003; 35: 199-202.
34. Mena C, Almeida G, Carneiro L, Teixeira P, Hogga T, Gibbs PA. Incidence of *Listeria monocytogenes* in different food products commercialized in Portugal. Food Microbiol 2004; 21: 213-216.