

CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* Y PRODUCCIÓN DE ENTEROTOXINAS DURANTE LA MANUFACTURA Y ALMACENAMIENTO DE QUESO “TELITA”

Growth and Enterotoxin Production by *Staphylococcus aureus* During Manufacture and Storage of Telita Type Cheese

Elisabetta Lucci^{1,*}, Claudia Benavides², Lilian Spencer³, Alberto Paz^{2,4} y Ronald Maldonado⁵

¹Universidad Simón Bolívar. Departamento de Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos.

²Universidad Simón Bolívar. Decanato de Estudios de Postgrado. ³Universidad Simón Bolívar. Departamento de Biología Celular.

⁴Universidad Metropolitana. Departamento de Procesos y Sistemas. ⁵Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía.

Instituto de Química y Tecnología. *Autor de correspondencia: Laboratorio de Microbiología de Alimentos.

Dpto. Tecnología de Procesos Biológicos y Bioquímicos. Universidad Simón Bolívar. Apartado Postal 89000.

Caracas 1080-A. Venezuela. Tel.: +58 212 9063947 Fax: +58 212 9063971. elucci@usb.ve

RESUMEN

El queso telita, es un queso artesanal, blanco, fresco, de pasta hilada, producido en Venezuela. Éste se elabora usualmente con leche no pasteurizada, bajo un procedimiento no estandarizado y se comercializa a temperatura ambiente, por lo que la presencia y crecimiento de patógenos constituye un riesgo potencial. En este estudio se evaluó el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y la producción de enterotoxinas durante la manufactura y almacenamiento de queso telita. Los quesos fueron elaborados con leche inoculada con dos niveles, 10^3 y 10^5 UFC/mL de una cepa enterotoxigénica de *S. aureus*, se fabricaron siguiendo el procedimiento artesanal y se almacenaron por 6 días (d) a dos temperaturas (25 y 12°C). La población de *S. aureus* se enumeró durante la manufactura (acidificación, cuajada, salazón y cocción) y almacenamiento (2; 4 y 6 d). Se determinó la presencia de enterotoxinas A y B mediante inmunoensayo de aglutinación pasiva reversa (SET RPLA). En la manufactura, la población de *S. aureus* disminuyó ($P \leq 0,05$) durante la etapa de cocción-hilado, cuando la temperatura en el interior del queso fue de 70°C/10min. Durante el almacenamiento, la refrigeración controló la población del microorganismo disminuyendo el número de células viables en un ciclo logarítmico a partir del día 2, mientras a temperatura ambiente se incrementó ($P \leq 0,05$) alcanzando valores de 10^7 y 10^6 UFC/g a los 2 y 4 d, con nivel de población inicial de 10^5 y 10^3 UFC/g, respec-

tivamente. Enterotoxinas A y B se detectaron solamente en las muestras almacenadas a 25°C con poblaciones de 10^7 UFC/g. En este estudio la temperatura/tiempo durante la cocción-hilado y la refrigeración en el almacenamiento influyeron significativamente ($P \leq 0,05$) en el crecimiento y sobrevivencia de *S. aureus*. Estos hallazgos permiten recomendaciones preventivas para mejorar la inocuidad del producto.

Palabras clave: Queso telita, *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas estafilocócica, inmunoensayo por aglutinación pasiva reversa.

ABSTRACT

Telita is an artisan, white, cooked paste fresh cheese produced in Venezuela. Commonly, it is made from unpasteurized milk following a not standardized procedure and marketed at room temperature, there for presence and growth of pathogens is a potential risk. The goal of this study is was to establish *Staphylococcus aureus* grown rate and enterotoxins production during telita cheese making and storage. Cheese samples are made using contaminated milk containing two different doses, 10^3 and 10^5 CFU/mL of a strain enterotoxigenic of *S. aureus*, following a traditional procedure and stored for 6 days at two different temperatures, 25 and 12°C. The population of *S. aureus* is determined during manufacture (acidification, curding, salting and cooking) and storage at days (d) 2, 4, and 6. Additionally, the presence of enterotoxins A and B is measured by reverse passive agglutination immunoassay

(SET RPLA). During telita type cheese manufacture, the population of *S. aureus* decreased ($P \leq 0.05$) while cooking at 70°C/10min. In storage, microorganism population is controlled by refrigeration, reducing the number of viable cells in one log cycle after day 2. However, at room temperature an increase ($P \leq 0.05$) of the microorganism population is observed, reaching final values of 10^7 and 10^6 CFU/g, after to 2 and 4 d storage, respectively, from samples with initial population level of 10^5 and 10^3 CFU/g, respectively. Enterotoxins A and B were detected only in 10^7 CFU/g samples stored at 25°C. This study shows that cooking temperature/time and refrigerated temperature throughout storage, significantly influenced ($P \leq 0.05$) growth and survival of *S. aureus*. These findings allows preventive recommendations for artesian cheese-makers to help improve product safety, use a cooking time relationship of 70°C/10min and a store temperature of 12°C.

Key words: Telita-type cheese, *Staphylococcus aureus*, enterotoxin production, reverse passive latex agglutination immunoassay.

INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus es uno de los principales microorganismos involucrados en intoxicaciones alimentarias a nivel mundial [22]. La leche [5, 45] y productos lácteos, especialmente quesos elaborados con leche cruda o subpasteurizada, han sido los alimentos usualmente implicados en los brotes [14, 32, 39].

La intoxicación estafilocócica, ocurre por la ingestión de pequeñas cantidades (20ng-1µg) [35] de una o más enterotoxinas estafilococcicas (SEs) preformadas en el alimento contaminado con *S. aureus*. Se han identificado 21 tipos antigénicos de SEs [3, 26], de éstas, las denominadas clásicas (SEA a SEE) se han asociado a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA), siendo SEA la que se ha reportado más frecuentemente [3, 45, 46].

La prevalencia de *S. aureus* en quesos se ha asociado al uso de leche cruda o subpasteurizada, o a la contaminación por fuentes humanas durante el proceso de elaboración [3, 25, 32]. *S. aureus* puede estar presente en la leche debido al ordeño de animales con mastitis clínica o subclínica [7, 43] y/o por inadecuadas prácticas higiénicas durante la obtención [24, 43]. Adicionalmente, condiciones deficientes de refrigeración y prolongados períodos de almacenamiento pueden favorecer el crecimiento del microorganismo a niveles de población considerados riesgosos ($>10^5$ UFC/mL) por producir SE en cantidad suficiente para una ETA [22].

El queso tipo telita es un queso blanco fresco de pasta hilada, de producción artesanal. Durante su manufactura, el uso de leche pasteurizada, tal como lo establece la Normativa Venezolana COVENIN 3822:03 [13] constituye una medida efectiva para eliminar *S. aureus*, así como otros microorganismos

patógenos no esporulados. Sin embargo, esta no es una práctica común [9], debido a que en la elaboración de este tipo de queso, no se utilizan cultivos iniciadores. El proceso de coagulación utilizado es esencialmente enzimático [4, 9] y las características propias de sabor y aroma del producto resultan del agregado de "suero ácido" proveniente de una producción anterior [9], por lo que la biota nativa de la leche tiene un rol en el desarrollo de las cualidades sensoriales.

Por otra parte, la pasteurización de la leche no previene la contaminación que puede ocurrir durante el proceso de manufactura del queso, donde las características finales, pH cercano a la neutralidad, bajo contenido de sal y alta actividad de agua (a_w), así como, la comercialización sin refrigeración, favorecen la subsistencia y multiplicación de *S. aureus* y la producción de SEs, representando un riesgo para la salud de los consumidores [32]. Estudios de la calidad microbiológica de queso telita han reportado presencia de *S. aureus* [28, 29] y de SEs en muestras con poblaciones $>10^3$ UFC/g [28].

El crecimiento de *S. aureus* y la producción de SEs durante la manufactura de quesos ha sido previamente evaluada [2, 20, 31, 33, 37, 41], y los resultados varían dependiendo del procedimiento de manufactura y las características intrínsecas del queso. Por lo que en este estudio se planteó como objetivo evaluar el crecimiento de *S. aureus* y la producción de SEs durante la manufactura y almacenamiento del queso artesanal tipo telita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa y condiciones de cultivo

Staphylococcus aureus, una cepa productora de enterotoxinas A y B (donada por la Dra. Astrid Miró, Dpto. de Microbiología de Alimentos, Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Caracas, Venezuela) fue aislado de queso blanco de producción artesanal involucrado en un brote ocurrido en el año 1999. La cepa fue reactivada en caldo cerebro corazón (CCC, Merck) a 35°C por 24 h y se verificó la pureza en agar Baird Parker (BP, Difco) suplementado con emulsión de yema de huevo al 50% y telurito de potasio al 1%, incubando (GCA Precision Scientific, Thelco 6M, EUA) a 35°C por 48 h, obteniendo solo colonias típicas en BP, las cuales fueron confirmadas por morfología microscópica, Gram, catalasa, oxidasa, coagulasa y el sistema API Staph (API®, BioMérieux, Francia) (porcentaje de identificación de 97,8). La producción de toxinas se verificó por el método de aglutinación en látex pasiva reversa (SET RPLA, Oxoid, Alemania) de acuerdo a procedimiento descrito posteriormente. El cultivo se mantuvo en agar tripticasa de soya (ATS, Merck) hasta su uso.

Preparación del inóculo

Un cultivo de 18 h de *S. aureus* en CCC se centrifugó a 7537g por 10 min en una microcentrífuga (Fisher Scientific, Micro14, EUA), se lavaron las células dos veces en solución

salina al 0,85% (p/v) y se resuspendió hasta una $Abs_{600nm} \sim 0,3714$ (Agilent Technologies, Cary 50 UV-Vis, EUA), para obtener una población $\sim 10^8$ UFC/mL, previamente estandarizada por recuento de células viables en ATS a 35°C por 48 h. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones en leche esterilizada (110°C por 10 min), para la contaminación de la leche modificada utilizada en el experimento modelo y de la leche pasteurizada utilizada en la manufactura de los quesos.

Crecimiento y producción de enterotoxinas en leche modificada

Se evaluó el crecimiento, la presencia de SEs y la resistencia térmica de la cepa de *S. aureus* en un experimento modelo, utilizando leche esterilizada suplementada con 3% de cloruro de sodio y ajustada a pH 6,08 para simular las características fisicoquímicas del queso tipo telita. La leche (3%NaCl;pH6,08) fue contaminada con dos niveles de población de *S. aureus* para obtener una concentración final baja $\bar{O}10^1$ o alta $\bar{O}10^3$ UFC/mL. Las muestras contaminadas se almacenaron a dos temperaturas (ambiente $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y refrigeración $12 \pm 2^\circ\text{C}$) por 6 d, realizando enumeración de *S. aureus* cada 48 h en ATS incubado a 35°C por 48 h y la detección de SEs por RPLA. La resistencia térmica se determinó a 65°C, temperatura promedio de cocción del queso telita.

Manufactura del queso telita

Los quesos fueron elaborados en una planta piloto de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela, Maracay, estado Aragua, siguiendo el procedimiento de manufactura artesanal, utilizando leche de vaca (*Bos taurus*) pasteurizada adquirida en la empresa Lactuario de Maracay C.A. La leche se mantuvo refrigerada a 5°C hasta su uso (~24 h) y se le determinó aerobios mesófilos y coliformes totales según requisitos microbiológicos de la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN 798:94) [12] y *S. aureus* por el Método del Número Más Probable (NMP) siguiendo la metodología descrita por COVENIN 1292:04 [10].

Se prepararon tres lotes de queso de pasta hilada, utilizando 20 L de leche para cada uno. Cada lote de leche se calentó hasta 35°C y se separó en dos volúmenes de 10 L para su contaminación. Se utilizaron dos niveles de inóculo de *S. aureus*, para obtener concentraciones finales en la leche de 10^3 UFC/mL (nivel bajo) y 10^5 UFC/mL (nivel alto). La leche se mantuvo en reposo por 45 min. Se agregó suero acidificado pH 3,45-3,84 en una proporción del 10% (p/v) para obtener un pH en la mezcla $\sim 5,8$ y se agregó 0,4 g de cuajo comercial (CHY-MAX®, Chr. Hansen, Alemania), se agitó lentamente por 10 min y se dejó reposar hasta completar la coagulación. Posteriormente, se cortó el gel de paracaseinato fosfato cálcico para obtener la cuajada y se procedió al desuerado parcial utilizando un contenedor perforado. Se pesó (AND Electronic balance, FY-2000, Japón) y se agregó cloruro de sodio (NaCl) hasta alcanzar una concentración del 3% en base al peso de la cuajada. Se prensó y moldeó por calentamiento hasta lograr

una masa hilante y homogénea (60-70°C por 10 min), consistencia típica de este tipo de queso. El producto terminado se enfrió a temperatura ambiente y se empacó en bolsas de polietileno con cierre hermético. Los quesos se almacenaron a 12 ± 2 y $25 \pm 2^\circ\text{C}$ por 6 d.

Las características finales de los quesos fueron pH: 6,0 y 7,0 (pH-Fix 0-14, Macherey-Nagel, Alemania), a_w : 0,973 \pm 0,002 (Decagon Devices, CX-1, EUA) y acidez titulable: 0,16 \pm 0,009 según metodología COVENIN 658:97 [11]. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Análisis microbiológico

Se realizó enumeración de *S. aureus* en las muestras de: 1) Leche pasteurizada antes de contaminar, 2) Leche pasteurizada contaminada, 3) Leche después de agregar el suero (acidificación), 4) Cuajada, 5) Cuajada después de la salazón, 6) Queso terminado y en el 7) Queso durante el almacenamiento a 12 y 25°C en los tiempos 2; 4 y 6 d.

La población de *S. aureus* se determinó por el método de recuento directo en placa siguiendo metodología descrita por COVENIN 1292:04 [10]. Se pesaron asépticamente 50 g de muestra y se le agregaron 450 mL de agua peptonada al 0,1% buferizada suplementada con 2% de citrato de sodio (JT Baker), se mezcló en un homogenizador (Lab-Blender, Stomacher 400, Inglaterra) por un min y se realizaron diluciones seriadas en agua de peptona al 0,1% buferizada. 1 mL de cada dilución se distribuyó, por duplicado, en la superficie de tres placas con agar BP y se incubó a 37°C por 48 h. Las colonias con características típicas, 1 a 3 mm, color negro brillantes con o sin doble halo fueron enumeradas y confirmadas mediante tinción Gram, catalasa y coagulasa. Los resultados se expresaron como Log (UFC/mL o g).

Detección de enterotoxinas

La presencia de SEs (SEA y SEB) se determinó utilizando un inmunoensayo de aglutinación pasiva reversa para detección de enterotoxinas estafilococcicas (SET RPLA, Oxoid). 10 g de muestra se homogeneizaron (Lab-Blender, Stomacher 400, Inglaterra) con 10 mL de solución salina al 0,85% (p/v) por 1 min, se centrifugaron a 6105g por 30 min a 4°C y se filtró el sobrenadante a través de una membrana de 0,22 μm (Millipore, Millex-GV, EUA). Se colocaron 25 μL del diluyente en cada pocillo de la placa de microtitulación y 25 μL de la muestra en el primer pocillo, a partir del cual se realizaron diluciones dobles hasta 1:8. Se homogeneizó por 1 min en un agitador (Heidolph, Tritamax 101, Alemania) y se agregaron 25 μL del látex sensibilizado con las SEs a ensayar. Se realizó el control del diluyente en las mismas condiciones. Las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 35°C por 24 h.

Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado con tres repeticiones. Para evaluar el crecimiento de *S. au-*

reus y el tiempo de detección de SEs (SEA-SEB), los tratamientos fueron dispuestos en un arreglo factorial 2² (niveles de inoculación inicial y temperaturas de almacenamiento). Las curvas de crecimiento se ajustaron utilizando un modelo lineal mixto y la prueba de comparación múltiple de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) [16]. Para evaluar el comportamiento de *S. aureus* durante el proceso de manufactura del queso telita, los tratamientos consistieron en las cuatro etapas del proceso de manufactura y los resultados fueron analizados utilizando un ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple DGC. Todos los análisis se realizaron utilizando InfoStat 2013 [15].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Crecimiento y producción de enterotoxina A en leche modificada

Los resultados del crecimiento de *S. aureus* y producción de enterotoxina en leche (3%NaCl;pH6,08) almacenada en dos temperaturas (25 y 12°C) se muestran en la FIG. 1.

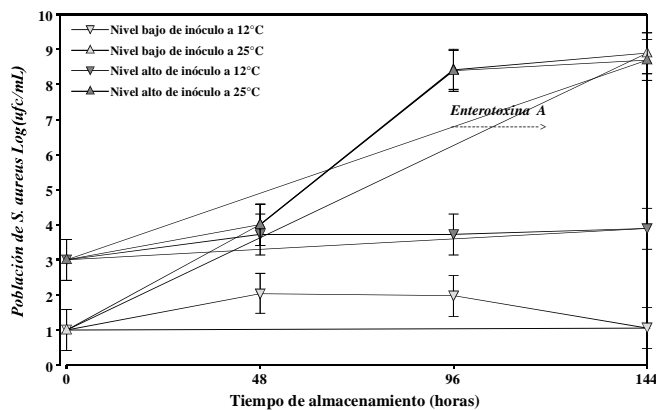


FIGURA 1. CRECIMIENTO DE *S. aureus* Y PRESENCIA DE ENTEROTOXINA A (SEA) EN LECHE MODIFICADA (3% NaCl; pH 6,08) SOMETIDA A DOS NIVELES DE INÓCULACIÓN INICIAL Y DOS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO. LA FLECHA INDICA LOS DATOS EN QUE SE DETECTÓ SEA.

La población de *S. aureus* aumentó significativamente ($P_{1/2,0,05}$), alcanzando un valor de ~8,4 Log (UFC/mL) a las 96 h en las muestras almacenadas a 25°C, independientemente del nivel inicial en la leche (10^1 o 10^3 UFC/mL), produciendo enterotoxina A (SEA) en cantidades detectables al alcanzar esta población. Mientras en la leche (3%NaCl;pH6,08) almacenada a 12°C, se controló el crecimiento del microorganismo hasta el final del almacenamiento para los dos niveles de contaminación, no detectándose SEA.

La leche es un buen sustrato para el crecimiento de *S. aureus*, sin embargo, la producción de SEA en el producto pasteurizado, es dependiente de la temperatura de almacenamiento [17, 19, 23], factor que influye en la velocidad de crecimiento del microorganismo y por tanto, en el tiempo para al-

canzar una densidad de población necesaria para la producción y detección de SEA. Adicionalmente, condiciones del medio, como pH y concentración de NaCl afectan el crecimiento de *S. aureus* [21] y la producción de enterotoxinas [36, 42] por un efecto individual o combinado.

En el presente trabajo se modificó el pH a 6,08 y la actividad de agua (a_w) a 0,98 por agregado de NaCl al 3% en la leche, para simular las características del queso tipo telita y se utilizaron temperaturas representativas del almacenamiento en refrigeración (12°C) y en ambiente (25°C) para evaluar el crecimiento y producción de SEA de esta cepa de *S. aureus* bajo estas condiciones. Los resultados mostraron que el microorganismo pudo crecer en la leche modificada, a diferentes combinaciones de nivel inicial de inóculo-temperatura, con tasas medias aproximadas de 28; 60 y 100% para los niveles bajo a 12°C; alto a 12°C y niveles bajo y alto a 25°C, respectivamente, en relación con el máximo valor observado. Sin embargo, densidades poblacionales para la inducción y producción de SEA solo se alcanzaron en el almacenamiento a temperatura ambiente, en las muestras con alto y bajo nivel de contaminación inicial. Evidenciándose, que en la leche modificada la temperatura de almacenamiento fue el factor que determinó el crecimiento de *S. aureus* y la producción de SEA.

Crecimiento y producción de enterotoxinas A y B durante la manufactura y almacenamiento de queso telita

Los resultados de la determinación de *S. aureus* durante el proceso de manufactura del queso telita elaborado a partir de leche contaminada con dos niveles de población, bajo 10^3 y alto 10^5 UFC/mL, se muestran en la FIG. 2 y los resultados del efecto de dos temperaturas de almacenamiento (ambiente y refrigeración) sobre la población y la producción de enterotoxinas A y B, se muestran en la FIG. 3.

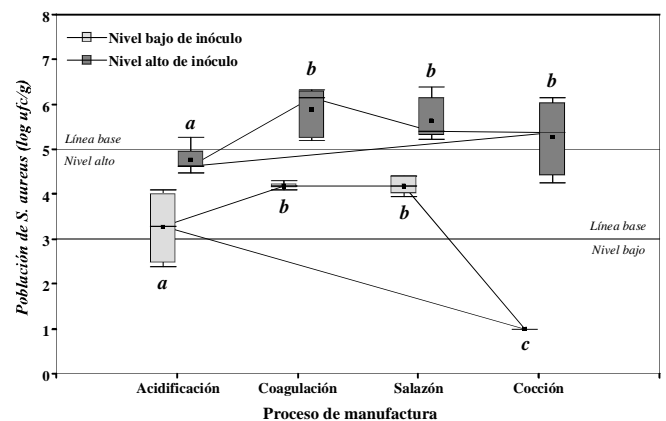


FIGURA 2. COMPORTAMIENTO DE DOS NIVELES DE POBLACIÓN DE *S. aureus* DURANTE LA MANUFACTURA DE QUESO TELITA. MEDIAS LETRAS DISTINTAS INDICAN DIFERENCIAS SIGNIFICATIVAS ($P_{1/2,0,05}$).

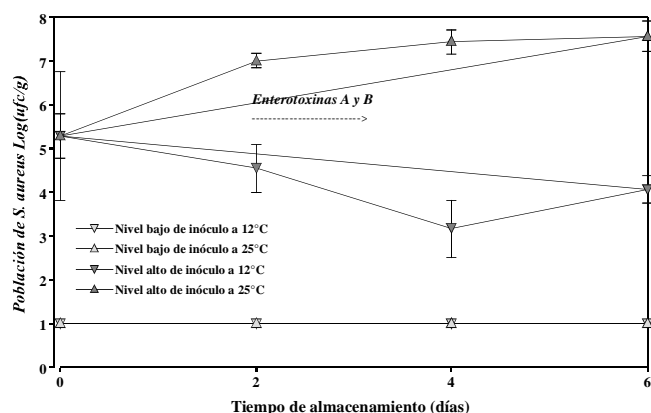


FIGURA 3. CRECIMIENTO DE *S. aureus* Y PRESENCIA DE ENTEROTOXINAS A Y B (SEA-SEB) EN QUESO TELITA SOMETIDO A DOS NIVELES DE INOCULACIÓN INICIAL Y DOS TEMPERATURAS DE ALMACENAMIENTO. LA FLECHA INDICA LOS DATOS EN QUE SE DETECTARON SEA Y SEB.

En la manufactura del queso telita, la población de *S. aureus* se caracterizó por un incremento en la etapa de coagulación alcanzando valores promedios de 4,198 y 5,867 Log (UFC/g) en las muestras elaboradas con leche de bajo y alto nivel de contaminación, respectivamente; para luego disminuir en la etapa de cocción-hilado a valores de 1,000 y 5,280 Log (UFC/g), respectivamente. El efecto del tratamiento de cocción sobre la población de *S. aureus* sólo fue significativo ($P \leq 0,05$) para las muestras con nivel bajo de contaminación inicial. Durante el almacenamiento, el comportamiento de *S. aureus* fue dependiente de la temperatura y la carga microbiana de los quesos. En las muestras con nivel alto de contaminación, que fueron almacenadas a temperatura ambiente (25°C), el recuento de *S. aureus* aumentó ($P \leq 0,05$) a partir del día 2, alcanzando un valor de 7,0 Log (UFC/g), que se mantuvo hasta el final del almacenamiento; mientras que a temperatura de refrigeración (12°C) se controló la población. En los quesos con nivel bajo de contaminación, no se recuperó el microorganismo a ninguna de las dos temperaturas utilizadas. En cuanto a la producción de SEs, se detectaron A y B (SEA y SEB) sólo en las muestras que alcanzaron poblaciones de 10^7 UFC/g durante el almacenamiento.

El incremento en el número de *S. aureus* en la etapa de coagulación durante la manufactura de los quesos, ha sido reportado previamente [2, 31, 37, 41], aumentos entre 1,0-1,5 unidades logarítmicas se deben al entrapamiento de las células del microorganismo en la cuajada durante el drenado del suero y no al crecimiento, por lo que esta etapa del proceso, no tuvo un efecto significativo sobre la población de *S. aureus* inicialmente presente en la leche.

En la etapa de cocción-hilado, la disminución de *S. aureus* estuvo relacionada con la temperatura alcanzada en el interior de la masa durante el calentamiento para el moldeo, la cual fue en promedio de 67°C/10min en las muestras con nivel

alto (10^5 UFC/mL) de contaminación de la leche y 70°C/10min en las muestras con nivel bajo (10^3 UFC/mL), con reducciones de la población de 0,04 y 2,22 unidades logarítmicas, respectivamente, no recuperándose el microorganismo en estas últimas. El análisis de los resultados indican que esta etapa del proceso tuvo un efecto sobre la viabilidad de esta cepa enterotoxigénica de *S. aureus*, pero este fue dependiente de la temperatura utilizada.

En la manufactura de este tipo de quesos, la temperatura para lograr la consistencia típica de masa hilante, oscila entre 70-80°C [9, 40], sin embargo, durante la elaboración del producto, dado que el procedimiento es artesanal, el punto en el cual se logra la consistencia de telita como resultado del amasado y estirado mecánico en caliente de la cuajada, no está determinado por la relación temperatura/tiempo, sino por la experiencia del fabricante durante la elaboración. Por lo que temperaturas inferiores a 70°C se pueden registrar durante la manufactura, tal como se observó en este estudio. Por otra parte, en el procedimiento de hilado, al ser realizado en forma manual, la cantidad de cuajada que se procesa por unidad de tiempo puede oscilar entre 3 y 6 kg, por lo que la relación temperatura/tiempo no necesariamente es la misma en todos los puntos de la masa.

Resultados similares, en cuanto a disminución de la viabilidad de *S. aureus* por el tratamiento térmico durante la manufactura de quesos, se ha reportado para los productos italianos: Canestrato Pugliese, con calentamiento de la cuajada en suero (80°C/30s) [1] y Parmigiano-Reggiano con cocción a 55°C y mantenimiento en el suero caliente por 60 min [38], con reducciones del microorganismo que fueron dependientes de la intensidad del tratamiento (temperatura y tiempo de exposición). Ercolini y col. [18] evaluaron el estrés térmico sobre *S. aureus* en queso Grana-Padano (cocción 55°C/20min y mantenimiento en suero caliente por 40 min), simulando las temperaturas promedio, en el interior y exterior de la cuajada, durante el enfriamiento. *S. aureus* no se recuperó cuando la temperatura se mantuvo a 55°C/60min (interior cuajada), por lo que los autores concluyeron, que el tratamiento térmico sólo es parcialmente efectivo para el control del microorganismo y dependerá de la relación temperatura/tiempo en toda la masa, sin embargo; este es un paso que puede ser utilizado como una barrera dentro del proceso tecnológico.

Dado lo anterior, aunque la etapa de cocción durante el moldeo (70°C/10min) puede constituir un punto de control en el proceso de manufactura del queso telita reduciendo significativamente la población de *S. aureus*, otros factores como la calidad microbiológica de la leche, deben ser controlados para disminuir el riesgo. Esto implica, vigilancia de la salud de los animales, adecuadas prácticas de ordeño y mantenimiento a temperaturas de refrigeración hasta el uso, especialmente, cuando la leche se destina para la elaboración de quesos frescos, los cuales no son sometidos a un proceso de maduración previo al consumo.

Otra consideración es la termorresistencia de *S. aureus*, la cual se ha reportado que es variable por diferencias implícitas de las cepas, por la edad del cultivo y por características del sustrato [44]. En la evaluación de la resistencia térmica de la cepa de *S. aureus* utilizada en este estudio, la cual se determinó en leche modificada, el valor $D_{65^{\circ}\text{C}}$ fue 6,29 min. (datos no mostrados), presentando una termorresistencia superior a la mayoría de cocos Gram positivos, la cual en alimentos con alta a_w , como la leche, oscila entre 1-6 min para un $D_{60^{\circ}\text{C}}$, pudiendo incrementar al disminuir el a_w del producto [6, 30]. En los quesos, el a_w fue $0,973 \pm 0,002$, por lo que pudiera esperarse valores D mayores a los obtenidos en el ensayo con la leche modificada. Adicionalmente, se han reportado cepas resistentes, $D_{70^{\circ}\text{C}}$ de 8 min, que en ensayos de exposición continua a 70°C aumentaron a 14 min. [6] y una cepa enterotoxigénica aislada en un brote en la India con un $D_{60^{\circ}\text{C}}$ de 16,10 min [34], por lo que estudios de la resistencia térmica de aislados de brotes de ETA podrían permitir establecer apropiadas combinaciones de la relación temperatura/tiempo para la elaboración de los quesos.

En el almacenamiento, la refrigeración permitió controlar el crecimiento de *S. aureus*, aún a niveles altos de inóculo inicial. Sin embargo, la conservación bajo estas condiciones afecta la textura característica de los quesos de pasta hilada [9, 27], por lo que usualmente se mantienen a temperatura ambiente durante su comercialización. Debido a esto, se realizó un ensayo para evaluar el comportamiento del microorganismo a una temperatura de almacenamiento de 25°C , cuando la carga inicial en el queso estaba en el orden de 10^3 UFC/g, según los criterios microbiológicos a nivel de planta y centros de distribución, establecidos en la Norma Venezolana COVENIN 3288:03 para quesos de pasta hilada [13] que permiten, dos muestras defectuosas de $n=5$, con un recuento de *S. aureus* hasta 1×10^3 UFC/g (valor M). Los resultados (datos no mostrados) presentaron una tendencia similar a la observada en los quesos con alto nivel de contaminación (10^5 UFC/mL); alcanzando poblaciones de 10^6 UFC/g a partir del día 4.

Durante este estudio, sólo se detectaron SEs (SEA y SEB) en el queso cuando el microorganismo alcanzó poblaciones de 10^7 UFC/g. Resultados similares para producción de SEA fueron reportados por Tatini y col. [41] en quesos Colby y Cheddar y por Akkaya y Can Sancak [2] en queso de hierbas. Sin embargo, poblaciones de *S. aureus* $\geq 10^6$ UFC/g fueron suficientes para producir SEA durante la manufactura de quesos tipo Manchego [20] y Camembert [31] y de 10^5 UFC/g en queso suave [33].

La producción de SEs está relacionada directamente con la densidad celular de *S. aureus*, pero también es afectada por las condiciones del medio (pH, a_w , concentración de sal, disponibilidad de oxígeno, microorganismos competidores) y por variaciones entre cepas. Para SEA, la diferencia de producción entre las cepas está correlacionada con la estructura de la región promotora y el fago transportador; por lo que no se puede generalizar una concentración celular del microorganismo con la cantidad de enterotoxina producida [8, 22], aún así,

se considera que niveles de población de *S. aureus* $>10^5$ UFC/mL o g, pueden producir una dosis efectiva para causar una ETA [22].

Los altos recuentos de *S. aureus* que se observaron en los quesos telita que fueron elaborados con leche inoculada con altas poblaciones del microorganismo (10^5 UFC/mL), fueron similares a los observados por Tatini y col. [41], Meyrand y col. [31] y Necidová y col. [33] en la manufactura de diferentes variedades de quesos, concluyendo que los recuentos de *S. aureus* y la cantidad de SEs están relacionados con la concentración inicial del microorganismo en la leche, por lo que han resaltando la importancia de bajos recuentos del microorganismo en la leche cruda utilizada para la manufactura de quesos.

En las muestras de queso telita que iniciaron el almacenamiento con poblaciones de 10^3 UFC/g, aún cuando no se detectó SEA, *S. aureus* alcanzó un número de población considerado de riesgo ($\sim 6,4$ Log UFC/g), a una temperatura controlada de 25°C , por lo que establecer condiciones de almacenamiento durante la distribución podría contribuir a minimizar el riesgo potencial de la presencia de SEA en los quesos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indican que durante la manufactura de queso telita, una adecuada combinación de temperatura/tiempo en la etapa de cocción, puede ser utilizada como un punto de control para inhibir el desarrollo de *S. aureus*. Sin embargo, esto no debe sustituir las buenas prácticas del ordeño, como vigilar la salud e higiene de los animales y la adecuación de los espacios destinados a la producción, ni las buenas prácticas durante la manufactura de los quesos, especialmente durante el transporte, almacenamiento y procesamiento de la leche destinada a su fabricación. La adecuada calidad microbiológica de la leche, así como prácticas higiénicas durante la elaboración y comercialización del producto pueden contribuir a minimizar el riesgo para la salud de los consumidores.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen al FONACIT por el aporte de los fondos a través del Proyecto 200800989, al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" por la donación de la cepa de *S. aureus* y al Laboratorio de Biometría y Estadística del IDEA por análisis estadístico de resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALBENZIO, M.; CORBO, M.R.; REHMAN, S.U.; FOX, P.F.; DE ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; SEVI, A.; GOBBETTI, M. Microbiological and biochemical characteristics of Canestrato Pugliese cheese made from raw milk, pasteurized milk or by heating the curd in hot whey. *Int. J. Food Microbiol.* 67: 35–48. 2001.

- [2] AKKAYA, L.; CAN SANCAK, Y. Growth abilities and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* strains in herby cheese. **Bull. Vet. Inst. Pulawy**. 51: 401-406. 2007.
- [3] ARGUDÍN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. Review. **Toxins**. 2: 1751-1773. 2010.
- [4] ARISPE, I.; WESTHOFF, D. Venezuelan white cheese: composition and quality. **J. Food Prot.** 47 (1): 27-35. 1984.
- [5] ASAO, T.; KUMEDA, Y.; KAWAI, T.; SHIBATA, H.; ODA, H.; HARUKI, K.; NAKASAWA, H.; KOSAKI, S. An extensive outbreak of Staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. **Epidemiol. Infect.** 130: 33-40. 2003.
- [6] BAIRD-PARKER, A.C.; HOLBROOK, R. The inhibition and destruction of cocci. In: **Inhibition and destruction of the microbial cell**. Hugo, W.B. (Ed) Academic Press INC, London, LTD. 370 pp. 1971.
- [7] BOYNUKARA, B.; GULHAN, T.; ALISARDI, M.; GURTURK, K.; SOLMAZ, H. Classical enterotoxigenic characteristics of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine subclinical mastitis in Van, Turkey. **Int. J. Food Microbiol.** 125: 209-211. 2008.
- [8] CRETENET, M.; EVEN, S.; LE LOIR, Y. Unveiling *Staphylococcus aureus* enterotoxin production in dairy products: a review of recent advances to face new challenges. **Dairy Sci. Technol.** 91: 127-150. 2011.
- [9] COLINA, P.; XIQUES, A. Caracterización estructural y funcional de la producción de queso guayanés en los municipios Piar y Padre Pedro Chien del estado Bolívar ante el ingreso de Venezuela al MERCOSUR. Kuawäi. **Rev. Arbitr. Dpto. Hombre y Ambiente**. 1 (1): 57-78. 2008.
- [10] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 1292-2004. Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* en Alimentos. 2004.
- [11] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 658-1997. Leche y sus derivados. Determinación de la acidez titulable (3ra. Revisión) 1997.
- [12] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 798-1994. Leche pasteurizada (2da. Revisión). 1994.
- [13] COMISIÓN VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). Norma Venezolana COVENIN: 3822-2003. Queso de pasta hilada. 2003.
- [14] DE BUYSER, M-L.; DUFOUR, B.; MAIRE, M.; LAFARGE, V. Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialized countries. **Int. J. Food Microbiol.** 67 (1-2): 1-17. 2001.
- [15] DI RIENZO, J.A.; CASANOVES, F.; BALZARINI, M.G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; ROBLEDO, C.W. InfoStat version 2013. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. On-Line: <http://www.infostat.com.ar/> 09-08-13.
- [16] DI RIENZO, J.A.; GUZMÁN, A.W.; CASANOVES, F. A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. **J. Agr. Biol. Environ. Stat.** 7 (2): 1-14. 2002.
- [17] DONNELLY, C.B.; LESLIE, J.E.; BLACK, L.A. Production of enterotoxin A in milk. **App. Microbiol.** 16(6):917-924.1968.
- [18] ERCOLINI, D.; FUSCO, V.; BLAIOTTA, G.; SARGHINI, F.; COPPOLA, S. Response of *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, and *Staphylococcus aureus* to the thermal stress occurring in model manufactures of Grana Padano cheese. **J. Dairy Sci.** 88: 3818-3825. 2005.
- [19] FUJIKAWA, H.; MOROZUMI, S. Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. **Food Microbiol.** 23:260-267. 2006.
- [20] GÓMEZ-LUCIA, E.;BLANCO, J.L.; GOYACHE, J.; de LA FUENTE, R.; VÁZQUEZ, J.A.; FERRI, E.F.R.; SUÁREZ, G. Growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* S6 in Manchego type cheese. **J. Appl. Bacteriol.** 61: 499-503. 1986.
- [21] IANDOLO, J.; ORDAL, Z.; WITTER, LL. The effect of incubation temperature and controlled pH on the growth of *Staphylococcus aureus* MF31 at various concentrations of NaCl. **Can. J. Microbiol.** 10:808-811. 1964.
- [22] JABLONSKY, L.M.; BOHACH, G.A. *Staphylococcus aureus*. In: **Food microbiology fundamental and frontiers**. Doyle, M; Beuchat, L.R.; Montville, T. (Eds). AMS Press. Washington DC, USA. Pp 353-375. 1997.
- [23] JANŠTOVÁ, B.; NECIDOVÁ, L.; JANŠTOVÁ, B. Comparing the growth of *S. aureus* and production of staphylococcal enterotoxin C in sheep's and goat's milk. **J. Microbiol. Biotech. Food Sci.**1: 758-768. 2012.
- [24] JØRGENSEN, H.J.; MØRK, T.; HØGÅSEN, H.R.; RØRVIK, L.M. Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in bulk milk in Norway. **J. Appl. Microbiol.** 99: 158-166. 2005.
- [25] KOUSTA, M.; MATARAGAS, M.; SKANDAMIS, P.; DROSINOS, E.H. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. **Food Contr.** 21: 805-815. 2010.
- [26] LONCAREVIC, S.; JØRGENSEN, H.J; LØVSETH, A.; MATICEN; T.; RØRVIK, L.M. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Int. Appl. Microbiol.** 98: 344-350. 2005.

- [27] MALDONADO, R.; LLANCA, B. Estudio de la calidad del queso de mano comercializado en el municipio Girardot, estado Aragua, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XVIII (4): 431-436. 2008.
- [28] MÁRQUEZ, J.G. Recuento de *Staphylococcus aureus* y detección de enterotoxinas estafilococcicas en queso blanco venezolano artesanal tipo "telita" expandido en mercados de la ciudad de Caracas. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.** 32: 112-115. 2012.
- [29] MÁRQUEZ, J.G.; GARCÍA, C.E. Microflora patógena del queso blanco "telita" elaborado en cuatro estados de Venezuela. **An. Ven. Nut.** 20 (1): 17-21. 2007.
- [30] MEDVEDOVÁ, A.; LUBOMÍR, V. *Staphylococcus aureus*: characterization and quantitative growth description in milk and artisanal raw milk cheese production. In: **Structure and function of food engineering.** Ayman Amer Eissa (Eds). InTech, Croacia. Pp 73-74. 2012.
- [31] MEYRAND, A.; BOUTRAND-LOEI, S.; RAY-GUENIOT, S.; MAZUY, C.; GASPARD, C.E.; JAUBERT, G.; PERRIN, G.; LAPEYRE, C.; VERNOZY-ROZAND, C. Growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* during the manufacture and ripening of Camembert-type cheeses from raw goats' milk. **J. Appl. Microbiol.** 85: 537-544. 1998.
- [32] MIRÓ, A.; RIOS, M. Calidad microbiológica de los quesos blancos venezolanos, analizados en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Período Enero 1988 a Junio 1998. **Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"** 30: 14-20. 1999.
- [33] NECIDOVÁ, L.; ŠTÁSTKOVÁ, Z.; POSPÍŠILOVÁ, M.; JANŠTOVÁ, B.; STREJCEK, J.; DUŠKOVÁ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R. Influence of soft cheese technology on the growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. **Czech. J. Food Sci.** 27 (2): 127-133. 2009.
- [34] NEMA, V.; AGRAWAL, R.; VRAT KAMBOJ, D.; KUMAR, A.; SINGH, L. Isolation and characterization of heat resistant enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* from a food poisoning outbreak in Indian subcontinent. **Int. J. Food Microbiol.** 117: 29-35. 2007.
- [35] NORMANO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E.; CELANO, G. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **Int. J. Food Microbiol.** 115: 290-296. 2007.
- [36] NOTERMANS, S.; HEUVELMAN, C.J. Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. **J. Food Sci.** 48:1832-1840.1983.
- [37] NÚÑEZ, M.; BAUTISTA, L.; MEDINA, M.; GAYA, P. *Staphylococcus aureus*, thermoestable nuclease and staphylococcal enterotoxins in raw ewes' milk Manchego cheese. **J. Appl. Bacteriol.** 65: 29-34. 1988.
- [38] PANARI, G.; PERINI, S.; MERIALDI, G.; DOTTORI, M. The behavior of potentially pathogenic bacteria in the production of Parmigiano-Reggiano cheese. **Sci. Tecn. Latt. Cas.** 55: 137-146. 2004.
- [39] RIOS, M.; NOVOA, M. Apoyo del departamento de microbiología de alimentos del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR) a la investigación de enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) **Rev. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"** 30: 8-13. 1999.
- [40] RODRÍGUEZ, C.; CALDAS, L.; OGEERALLY, P. Calidad sanitaria en queso artesanal tipo telita. Upata, estado Bolívar, Venezuela. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.** 29: 98-102. 2009.
- [41] TATINI, S.R.; JEZESKI, J.J.; MORRIS, H.A.; OLSON, J.C.; CASMAN, E.P. Production of staphylococcal enterotoxin A in Cheddar and Colby cheese. **J. Dairy Sci.** 54: 815-825. 1971.
- [42] VALERO, A.; PÉREZ-RODRÍGUEZ, F.; CARRASCO, E.; FUENTES-ALVENTOSA, J.M.; GARCÍA-GIMENO, R.M.; ZURERA, G. Modeling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. **Int. J. Food Microbiol.** 133:186-194. 2009.
- [43] VALERO-LEAL, K.; RIVERA-SALAZAR, L.; VALBUENA, E.; BOSCÁN, L.; VALERIS, R.; CASTRO, G.; BRÍÑEZ, W. Caracterización bioquímica y producción de enterotoxinas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de leche cruda y queso fresco artesanal en fincas del estado Zulia. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XXII (4): 303-314. 2012.
- [44] WALKER, G.C.; HARMON, L.G. Thermal Resistance of *Staphylococcus aureus* in milk, whey, and phosphate buffer. **Appl. Microbiol.** 14 (4): 584-590. 1966.
- [45] WEILER, N.; LEOTTA, G.; ZARATE, M.; MANFREDI, E.; ALVAREZ, M.; RIVAS, M. Brote de intoxicación alimentaria asociado al consumo de leche ultrapasteurizada en la República del Paraguay. **Rev. Argent. Microbiol.** 43: 33-36. 2011.
- [46] YAN, X.; WANG, B.; TAO, X.; HU, Q.; CUI, Z.; ZHANG, J.; LIN, Y.; YOU, Y.; SHI, X.; GRUNDMANN, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* strain associated with food poisoning in Shenzhen, China. **Appl. Environ. Microbiol.** 78 (18): 6637-6642. 2012.