

Caracterización de cepas de *Listeria* aisladas de embutidos comercializados en Cumaná, estado Sucre, Venezuela

Noris García Jordán, Luz B. Villalobos* y Rosa Martínez N.

Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.
Cumaná, Venezuela.

Recibido: 28-04-08 Aceptado 11-05-09

Resumen

Los alimentos “listos para el consumo” como son los embutidos, se han visto implicados en brotes de listeriosis en el mundo. Siendo estos productos de consumo masivo entre la población venezolana, se planteó determinar la incidencia de las diferentes especies del género *Listeria* con especial atención en *Listeria monocytogenes*, en embutidos comercializados en el Mercado Municipal de Cumaná. Se colectaron 60 muestras de jamón y 45 muestras de salchichas. El aislamiento de las cepas se llevó a cabo según la técnica descrita en el Bacteriological Analytical Manual de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA). La identificación se realizó por API *Listeria* y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). De las 105 muestras analizadas se aislaron 33 cepas sospechosas de ser *Listeria*. En el 25% de las muestras positivas de jamón, se identificaron: *L. innocua* 9(15%), *L. ivanovii* 5(8,33%) y *L. grayi* 1(1,66%). En las muestras de salchichas el 40% mostraron contaminación por: *L. monocytogenes* 4(8,88%), *L. ivanovii* 2(4,44%), *L. welshimeri* 8(17,77%) y *L. innocua* 4(8,88%). La PCR confirmó la identificación de las especies. Los resultados obtenidos ponen en evidencia el riesgo de consumo de embutidos contaminados con especies del género *Listeria* lo que hace indispensable un monitoreo constante de estos alimentos, para la prevención de posibles brotes.

Palabras clave: embutidos, *Listeria*, PCR.

Characterization of strains of *Listeria* isolated in stuff commercialized in Cumana, Sucre state, Venezuela

Abstract

The “ready to eat foods” like ham and sausages, have been implied in listeriosis outbreaks in the world. Being these products of massive consumption among the Venezuelan population, the main objective of this research was to determinate the incidence of *Listeria* sp and *Listeria monocytogenes* in ham and sausages expended in the Municipal Market of Cumaná. We collected 60 ham samples and 45 sausages samples; the isolation of the strains was carried out according to the technique described in the Bacteriological Analytical Manual of the FDA, and the identification by API *Listeria* and PCR. Of the 105 analyzed samples, 33 suspicious strains of being *Listeria* were isolated. 25% of ham positive samples were identified: *L. innocua* (9)(15%),

* Autor para la correspondencia: lbvillalobosb@yahoo.com

L. ivanovii 5 (8,33%) and *L. grayi* (1 (1,66%). 40% of sausages positive sample showed to be contaminated by *Listeria* species: *L. monocytogenes* (48,88%), *L. ivanovii* 2 (4,44%), *L. wesheimeri* 8 (17,77%) y *L. innocua* 4 (8,88%). PCR confirmed the identification of the species. These results evidence the risk of consumption of *Listeria* stuff contaminated and suggest the need of a constant monitoring program of these foods for prevention of possible outbreaks.

Key words: sausages, ham, *Listeria*, PCR.

Introducción

Listeria monocytogenes se describió por primera vez en 1926 y se documentó por primera vez la transmisión por alimentos en 1981 en Nueva Escocia, Canadá (1). Para las personas se le ha considerado normalmente como un germen oportunista, que aparece fundamentalmente en mujeres embarazadas, en niños o de manera ocasional cuando las personas se encuentran en alguna situación de riesgo, es decir, inmunodeprimidos (2).

Esta bacteria se caracteriza por ser un contaminante ambiental ampliamente distribuido, cuyo medio primario para la transmisión al hombre es a través de la contaminación de los alimentos en cualquier fase en la cadena alimentaria, bien sea durante la producción en el campo, el procesamiento, la distribución o preparación para el consumo (3).

De las seis especies que conforman al género, *Listeria monocytogenes* es la causante de la infección conocida como listeriosis, una enfermedad poco frecuente pero grave que afecta al hombre y a los animales. Se reveló como un fenómeno de gran interés a partir de la década del ochenta, donde se comenzaron a apreciar diversos episodios asociados a la alimentación (4). Su incidencia es diferente de un país a otro y se presenta tanto en forma epidémica como esporádica (5), tiene un prolongado período de incubación y sus manifestaciones clínicas son muy variadas, por lo que se dificulta el diagnóstico y se eleva la letalidad (6). Las principales formas clínico patológicas de la listeriosis son: encefalitis, septicemia, meningi-

tis (fundamentalmente del feto o del recién nacido), aborto y muerte neonatal (7, 8).

En la actualidad, *L. monocytogenes* se considera como uno de los patógenos emergentes más importantes de origen alimentario, dado que resiste diversas condiciones ambientales como pH bajo, altas concentraciones de sal y, sobre todo, tiene la capacidad de sobrevivir a temperaturas de refrigeración (2-4°C), logrando que se constituya en una serie amenaza a la seguridad de la industria alimentaria (5).

Los alimentos asociados más frecuentemente con listeriosis humana son los productos listos para consumir, ya que tienen un tiempo de conservación prolongado en condiciones de refrigeración y además se consumen sin tratamiento listericida (9-11).

Los alimentos listos para el consumo, tales como jamones y salchichas (12, 13), han sido considerados como vehículos frecuentes en la transmisión de *L. monocytogenes*. Específicamente en Estados Unidos existen informes de brotes en varios estados relacionados con el consumo de salchichas tipo "frankfurters" y jamones, entre otros. En otros países como Portugal se ha encontrado que cerca del 15% de los alimentos listos para el consumo están contaminados con *L. monocytogenes* (14). En Colombia se ha determinado la incidencia de este microorganismo en quesos y leche no pasteurizada (15), así como en derivados cárnicos listos para el consumo (16).

En Venezuela la incidencia de las diferentes especies de *Listeria spp* y *L. monocytogenes* en embutidos, no ha sido reportada. La data refleja el estudio del creci-

miento y caracterización de este microorganismo a nivel de vegetales crudos y procesados, pescados, quesos, entre otros (17-19).

Como un aporte al conocimiento del nivel de contaminación con *Listeria spp* y *L. monocytogenes* de embutidos procesados de forma artesanal, el presente estudio tuvo como objetivo determinar la incidencia de estos microorganismos en muestras de jamones y salchichas procedentes del Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná, estado Sucre, Venezuela.

Materiales y métodos

Recolección de muestras

105 muestras fueron colectadas (60 muestras de jamón rebanado y 45 de salchichas ofrecidas al detal). Las muestras de 250 gramos cada una, fueron obtenidas de los diferentes puntos de venta del Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná y transportadas en cavas refrigeradas para su posterior análisis.

Cepas controles de referencia

Para la realización de los ensayos de aislamiento e identificación bioquímica, se utilizó como cepa control (*Listeria spp* 337) y para confirmar la especificidad del método de PCR, se empleó la cepa (*Listeria monocytogenes* 445) y (*Listeria innocua* 448) ambas certificadas por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) (20).

Aislamiento de cepas presuntivas de *Listeria spp*.

Se trabajó con el método de determinación de *Listeria spp*. del Manual Analítico Bacteriológico de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) de los Estados Unidos, en su edición N° 7 (21).

Para el aislamiento se procedió a un enriquecimiento primario de las muestras en caldo de enriquecimiento *Listeria* (LEB)

con suplemento Oxford (Oxoid), a una temperatura de incubación de 30°C por 48 horas. Posterior a la incubación, se sembraron por duplicado alícuotas del cultivo enriquecido en placas conteniendo agar Oxford (Oxoid) y Palcam (Merck) y se incubaron a 30°C por 72 horas. Una vez confirmadas las colonias presuntivas (verde gris con halo negro o marrón), se aislaron y se transfirieron a placas que contenían agar tripticasa de soya (Merck) con 0,6% de extracto de levadura (Merck) para verificar la pureza de las colonias que van a ser probadas en la identificación bioquímica.

Identificación bioquímica y por PCR de las cepas aisladas

La identificación bioquímica se inició con la tinción de Gram de cada una de las cepas aisladas y, una vez corroborado la presencia de bacilos Gram positivos cortos, se realizó las siguientes pruebas: motilidad en paraguas a 25°C, catalasa (peróxido de hidrógeno al 30%), oxidasa, prueba de Voges-Proskauer, reacción de rojo de metilo, fermentación de sustratos: manitol, lactosa, xilosa, ramnosa, hidrólisis de esculina y hemólisis en agar con 5% de sangre de cordero. Los resultados de identificación por pruebas bioquímicas convencionales, fueron confirmados por el uso de galerías API *Listeria* del sistema de identificación automatizado ATB Expression (Programa API PLUS) de la Bio-Merieux.

La identificación por PCR se realizó siguiendo la metodología de Bubert y col., (22). Como primer paso, se procedió a extraer el ADN de cada una de las cepas identificadas utilizando el kit de extracción de ADN genómico (Wizard® SV Genomic DNA Purification System, Promega Corporation, Madison, EEUU). Una vez purificado el ADN, se procedió a realizar tres amplificaciones por PCR. Un primer ensayo para identificar la especie: *L. monocytogenes*. Un segundo ensayo para *L. innocua* y un tercer ensayo para identificar las especies restantes (*L. welshimeri*, *L. seeligeri* *L. ivanovii*) con oligo-

nucleótidos derivados de la región conservada del extremo 3' del gen *iap* (tabla 1), el cual es común en todos los miembros del género *Listeria* y en además codifica para una proteína extracelular grande (p60), que ha sido mostrada como una mureína hidrolasa, requerida para la adherencia de *L. monocytogenes* en los órganos blancos (22).

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 µL, utilizando buffer de *Taq* polimerasa (10Mm Tris HCl, pH 9,0, 50 Mm de KCl y 0,1% de Triton X-100) (Invitrogen-Brazil), 1,5 Mm de MgCl₂ (Invitrogen-Brazil), 100 nanogramos de cada desoxirribonucleótido trifosfato (Invitrogen-Brazil), 1,5 unidades de *Taq* polimerasa (Invitrogen-Brazil), 100 ng cada uno de los oligonucleótidos (Sigma Aldrich Genosys. EEUU) y 2 µL del ADN purificado para la reacción. El programa de amplificación aplicado: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, 35 ciclos a 94°C por 5 minutos para la desnaturalización, 58°C por 30 segundos para la hibridación de los iniciadores, 72°C por 45 segundos para la extensión y 1 ciclo a 72°C por 10 minutos para la extensión final. Los productos amplificados fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% a 80 V por 50 minutos, utilizando un marcador de peso molecular de 1 kb (Promega), en buffer Tris acetato-etilén diaminotetraacético (TAE) 1X. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador ultravioleta usando coloración

con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 mg/mL y fotografiado con una cámara digital Sony.

Resultados y discusión

Aislamiento e identificación bioquímica

De 105 muestras de embutidos, 33 (34,5 %) resultaron positivas a la contaminación por *Listeria spp.* Las pruebas de aislamiento, identificación convencional y API listeria arrojaron que 5 de las 6 especies conocidas del género *Listeria*, estaban presentes en los productos analizados. La distribución de las 5 especies fue la siguiente: 4 (12,12 %) *L. monocytogenes*, 13 (39,39%) *L. innocua*, 7 (21,21%) *L. ivanovii*, 8 (24,24%) *L. welshimeri* y 1 (3,03%) *L. grayi*. La especie *L. seeligeri* no logró ser aislada en este estudio.

La distribución de especies listéricas de acuerdo al producto analizado, fue la siguiente: de las 60 muestras de jamón, 9 fueron positivas para el aislamiento e identificación de *L. innocua*, 5 a *L. ivanovii* y 1 a *L. grayi*. Con respecto a las 45 muestras de salchichas, 4 fueron positivas para el aislamiento de *L. monocytogenes*, 2 para *L. ivanovii*, 8 para *L. welshimeri* y 4 para *L. innocua* (tabla 2).

A excepción de *L. innocua*, los porcentajes de aislamientos de especies de *Listeria* observados en este estudio son considerablemente altos con respecto a los reportados por Martino y col. (8), los cuales en un estu-

Tabla 1

Secuencias de los oligonucleótidos iniciadores en la técnica de PCR para la identificación de *Listeria sp* y *Listeria monocytogenes*.

Primers	Secuencia (5' → 3')	Combinación de iniciadores	Producto de PCR esperado
MonoA	CAAAGTCTAACACAGCTACT	MonoA y Lis1B (<i>L. monocytogenes</i>)	660 bp
Lis1B	TTATACGCGACCGAAGCCAAC	Ino2 y Lis1B (<i>L. innocua</i>)	870 bp
Ino2	ACTAGCACTCCAGTTGTTAAAC	Siwi2 y Lis1B (<i>L. ivanovii</i> , <i>L. seeligeri</i>)	1.2 kb
Siwi2	TAAGTGGTAGCGAGCGAA	(<i>L. welshimeri</i>)	

Tabla 2
Distribución de especies de *Listeria* según el tipo de embutido analizado.

Especie identificada (n = 60)	Producto Alimenticio	
	Jamón (n = 60)	Salchichas (n = 45)
<i>L. monocytogenes</i>	0 (0%)	4 (8,88%)
<i>L. innocua</i>	9 (15%)	4 (8,88%)
<i>L. welshimeri</i>	0 (0%)	8 (17,77%)
<i>L. grayi</i>	1 (1,66%)	0 (0%)
<i>L. ivanovii</i>	5 (8,33%)	2 (4,44%)

dio realizado en embutidos y productos ahumados lograron aislar 10% de *L. innocua*, 5% de *L. ivanovii* y solo 2% de *L. monocytogenes*. De igual modo se pudo observar que el porcentaje de muestras positivas a la contaminación por *Listeria spp* (34,5 %), también es relativamente alta respecto a las muestras positivas encontradas por Marzocca y col. (23) en una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina, donde lograron confirmar la contaminación por *L. monocytogenes* y *L. welshimeri* en 10% y 3,3%, respectivamente de los fiambres enteros envasados al vacío y en 5% de los fiambres trozados envasados al vacío.

McLaunchlin (24), Glass y col. (25), hacen referencia que las carnes o productos cárnicos que sufren procedimientos de conservación basados en la maduración o el calentamiento, los resultados de aislamientos de especies listericas suelen ser diversos. Por ejemplo, para aquellos curados mediante salazón, desecación y/o adición de sales nitrificantes, la *L. monocytogenes* se detecta en porcentajes que oscilan entre 2,7 y 72,2%, gracias a que este patógeno es capaz de sobrevivir al proceso de fermentación, permaneciendo viable en estos productos durante su almacenamiento a temperatura de refrigeración. Esta referencia podría explicar el hecho de que los dos productos analizados en este estudio, solo las salchichas mostraron un 12,12 % de contaminación por *L. monocytogenes*.

Identificación por PCR

Los resultados hallados por aislamiento e identificación bioquímica fueron confirmados por el PCR a excepción de la cepa identificada como *L. grayi*, la cual no se sometió al ensayo por falta de cebadores específicos para su identificación.

La primera combinación de oligonucleótidos (Tabla 1) confirmó en 4 muestras (del total de 32) la contaminación por *L. monocytogenes*, con un producto de amplificación de aproximadamente 660 bp (figura 1). La segunda combinación de oligonucleótidos (Tabla 1) para la identificación específica de *L. innocua*, reveló productos de amplificación de aproximadamente 870 bp en 13 muestras analizadas por el método convencional (figura 2). En adición, 15 muestras más resultaron positivas por PCR para la confirmación de posible contaminación por cualquiera de las tres especies agrupadas de *Listeria* (*L. welshimeri* - *L. seeligeri* - *L. ivanovii*) (figura 3). Todos los productos amplificados mostraron bandas de aproximadamente 1.2 kb.

De acuerdo a los resultados obtenidos por el procedimiento microbiológico y molecular, se puede inferir que la presencia de especies de *Listeria* en los embutidos analizados y en particular la especie patógena a humanos (*L. monocytogenes*) en salchichas, sugiere la posibilidad de que el grado de procesamiento de un embutido así como la adición de conservantes comunes como el clo-

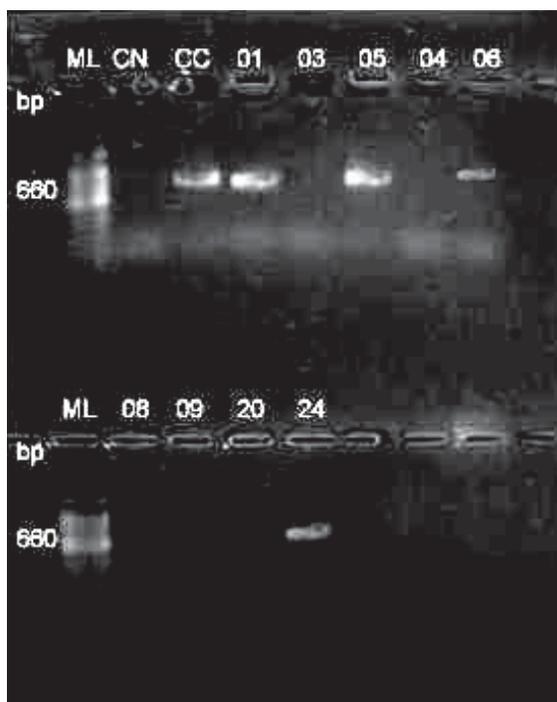


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados con los oligonucleótidos específicos para la identificación de *L. monocytogenes* (MonoA y Lis1B). Pozo 1: Marcador con talla molecular de 1 kB; Pozo 2: (CN) Control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde); Pozo 3: (CC) Control Positivo (Cepa certificada de *L. monocytogenes* 445); Pozo 4: Muestra 1 de salchicha; Pozo 6: Muestra 5 de salchicha, Pozo 8: Muestra 6 de salchicha; Pozo 14: Muestra 24 de salchicha.

ruro de sodio y el nitrito, la cadena de frío y la inadecuada manipulación posterior a la producción del producto, son cuatro factores que influyen notoriamente en el establecimiento y multiplicación de *Listeria spp.* y *L. monocytogenes*, por lo que a la hora de preservar estos productos, estos factores deben tomarse en consideración para así brindarle al consumidor un producto libre de *Listeria*.

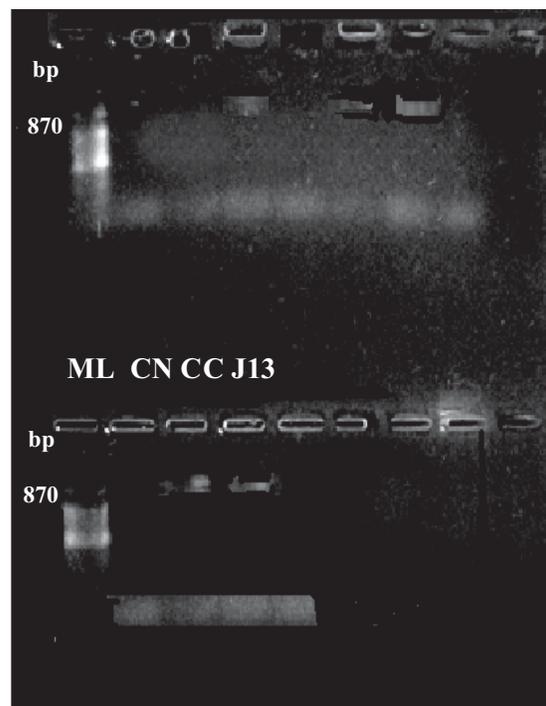


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa con algunos de los productos amplificados con los oligonucleótidos específicos para la identificación de *L. innocua*. (*Ino2* y *Lis1B*). Pozo 1: Marcador con talla molecular de 1 kB; Pozo 3: (CN) Control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde); Pozo 4: (CC) Control Positivo (Cepa certificada de *Listeria innocua* 448); Pozo 6: Muestra 2 positiva de jamón, Pozo 7: Muestra 8 positiva de jamón; Pozo 11: Muestra 13 positiva de jamón.

Conclusiones

El estudio realizado sugiere que las salchichas que se expenden en el Mercado Municipal de la ciudad de Cumaná, son alimentos que potencialmente pueden verse involucrados en brotes de listeriosis.

La PCR confirmó la presencia de especies listéricas previamente identificadas por bioquímica convencional y por API.



Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa con algunos de los productos amplificados con los oligonucleótidos específicos para la identificación de las especies agrupadas (*L. welshimeri* - *L. seeligeri* - *L. ivanovii*) (Siwi1 y Lis1B). Pozo 1: Marcador con talla molecular de 1 kB; Pozo 2: (CN) Control negativo (mezcla de reacción sin ADN molde); Pozo 3: (CC) Control Positivo (Cepa certificada de *L. innocua* 448); Pozo 5: Muestra 3 de salchicha; Pozo 8: Muestra 5 de salchicha, Pozo 8: Muestra 6 de salchicha; Pozo 11: Muestra 8 de jamón y Pozo 12: Muestra 9 de jamón.

Referencias bibliográficas

- SCHLECH W.F., LAVIGNE P.M., BORTOLOUSSI A.C., ALLEN A.C., HALDANE E.V., WORT A.J., HIITOWER A.W., JHONSON SE., KING S.H., NICHOLLS E.S., BROOME C.V. *N England J Med* 308:203-206.1983.
- GULERIA I., POLLARD J. *Infect Immun* 69: 1795-1807. 2001.
- LAPPI R., HO A., GALL K., WIEDMANN M. *J Food Prot* 67(5): 1022-1026.2004.
- MARTÍNEZ N. *Listeria monocytogenes. Agentes patógenos transmitidos por alimentos* Vol. I. Jalisco Torres Editores. Torres. pp: 263-309. 2002.
- ESPINOZA A., DE LA TORRE M., SALINAS M., SÁNCHEZ V. *Rev Med Exp Salud* 21(2): 55-62. 2004.
- VAZQUEZ-BOLAND J.A., KUHN M., BERCHE P., CHAKRABORTY T., DOMINGUEZ-BERNAL G., GOEBEL W. *Clin Microbiol Rev* 14:584-640. 2001.
- RYAN K., RAY G., SHERRIS J. *Microbiología Médica*. 4ta edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México.2004.
- MARTINO T., LEYVA V., PÉREZ A., DE LOS REYES M., SUÁREZ F., LARA C. *Rev Cubana Salud Pública* Vol. 31 (3):217-222.2005.
- TORRES K., POUTOU R., CARRASCAL A., SIERRA S., MERCADO M. *MVZ-Córdoba* 9(2): 414-427. 2004.
- CORDANO A., ROCOURT J. *Int J Food Microbiol* 70: 175-178. 2001
- VITAS A., AGUADO V., GARCIA-JALON I. *Int J Food Microbiol* 90: 349-356. 2004.
- MURPHY R., BERRANG M. *J Food Prot* 65: 1561-4. 2002.
- BARMPALIA I., GEORNARAS I., BELK K., SCANGA J., KENDALL P., SMITH G. *J Food Prot* 67: 2456-64.2004.
- WALLACE M., CALL J., PORTO C., COCOMA G., LUCHANSKY B. *J Food Prot* 66: 584-91. 2003.
- MEDRANO M., RESTREPO S., VANEGAS M. *Biomédica* 26(3): 442-450.2006.
- VANEGAS M., VEGA C., MARTÍNEZ A., FORERO P., CASAS C. *Memorias VIII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos*. Bogotá, Mayo 18-21 de 2005, p 27.

17. CURTIS M., FRANCESCHI O., CASTRO N. **ALAN** 52(3): 523-530.2002
18. MARTÍNEZ N. R.E., VILLALOBOS DE B. L.B. **Rev Cient FCV-LUZ** IV: 291-296. 2004.
19. VILLALOBOS DE B. L.B., MARTÍNEZ N. R.E. **Rev Cient. FCV-LUZ** XVII (5): 529-536. 2007.
20. CENTRO VENEZOLANO DE COLECCIONES DE MICROORGANISMOS (CVCM). Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela. Caracas (Venezuela). 1996.
21. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Bacteriological Analytical Manual**. Capítulos 10 y 11. Edition U.S.A. 1992.
22. BUBERT A., HEIN I., RAUCH M., LEHNER A., BYOUNGSU Y., WERNER G., WAGNER M. **Appl Environ Microbiol** 65(10): 4688-4692. 1999.
23. MARZOCCA M., MARUCCI P., SICA M., ALVAREZ E. **Rev Argent Microbiol** 36(4): 179-181.2004.
24. MCLAUNCHLIN J. **Bacteriol** 63:1-11. 1994.
25. GLASS K, DOILE M. **J Food Prot** 53:739-41. 1990.