

Aislamiento e identificación de *Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp. en embutidos secos obtenidos en mercados de la ciudad de La Plata, Argentina

K. PELLICER¹, J. COPES¹, L. MALVESTITI¹, M. LANFRANCHI¹, N. STANCHI²,
G. ECHEVERRIA³, E. NOSETTO³

¹Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos, ²Cátedra de Microbiología, ³Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, CC 296, B1900AVW La Plata, Argentina. Correspondencia. Fax: 0221-4257980. E-mail: jcopes@fcv.unlp.edu.ar

RESUMEN

En el presente trabajo se analizaron 60 muestras de embutidos secos (50 de salamines y 10 de chorizos tipo candelario) obtenidas al azar de mercados habilitados para su comercialización, con la finalidad de evidenciar la presencia de bacterias del género *Listeria* (*Listeria monocytogenes* y *Listeria* spp). Los resultados obtenidos en salamines fueron los siguientes: 10 (20%) aislamientos de *Listeria* spp, siendo caracterizadas 1 (2%) cepa como *L. monocytogenes* tipo 1, 7 (14%) cepas como *L. innocua* y 2 (4%) cepas como *L. welshimeri*. En chorizos tipo candelario se hallaron 6 (60%) aislamientos de *Listeria* spp, siendo caracterizadas 2 (33%) cepas como *L. monocytogenes* tipo 1 y 4 (66%) cepas como *L. innocua*. Los porcentajes totales de aislamientos fueron 26,6% de *Listeria* spp., 5% de *L. monocytogenes* tipo 1, 18,3% de *L. innocua* y 3,3% de *L. welshimeri*. Con los resultados obtenidos se considera que se deberán desarrollar e implementar metodologías de proceso y control con la finalidad de garantizar la inocuidad de estos productos.

Palabras claves: *Listeria monocytogenes*, embutidos secos.

SUMMARY

Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. in dry sausages obtained from markets of La Plata, Argentina. A total of 60 samples of dry sausages were analyzed (50 of "salami" and 10 of "chorizo" "candelario" type) obtained at random in markets authorized for their commercialization, for the purpose of evidencing the presence of bacteria of the genus *Listeria* (*Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp.). The results obtained in salami were the following: 10 (20%) isolates of *Listeria* spp., were characterized: 1 (2%) strain as *L. monocytogenes* type 1, 7 (14%) strains as *L. innocua*, 2 (4%) strains as *L. welshimeri*. In chorizo candelario type 6 (60%) isolates of *Listeria* spp., were characterized: 2 (33%) strains as *L. monocytogenes* type 1 and 4 (66%) strains as *L. innocua*. The total percentages of isolations were: 26.6% of *Listeria* spp., 5% of *L. monocytogenes* type 1, 18.3% of *L. innocua* and 3.3% of *L. welshimeri*. In conclusion, we consider that methodologies of control must be developed and implemented in order to guarantee the innocuity of these products.

Key words: *Listeria monocytogenes*, dry sausage.

Listeria monocytogenes es el agente etiológico de la listeriosis en humanos y animales. En épocas pasadas se consideraba una enfermedad perinatal; hoy se ha demostrado un amplio rango de manifestaciones clínicas que incluyen meningoencefalitis, septicemia, neumonía, endocarditis, abscesos localizados, lesiones cutáneas, conjuntivitis, etc. Esta enfermedad adquiere mayor importancia en poblaciones susceptibles, produciendo

alta mortalidad en los infectados (12, 15, 19, 21). Una de las vías más importantes de transmisión es a través del consumo de alimentos contaminados por esta bacteria y, en especial, los alimentos denominados "listos para comer", ya que no se les aplicará ningún proceso tecnológico para la eliminación del microorganismo antes de ser consumidos. En los alimentos que han sufrido algún proceso térmico como el de cocción

o pasteurización, la contaminación se produce por fallas en la higiene del establecimiento y deficientes prácticas de manufactura posteriores a la elaboración del producto (21).

L. monocytogenes posee la capacidad de sobrevivir en el ambiente, lo que le permite permanecer viable suficiente tiempo en utensilios usados en la fabricación y fraccionamiento de los alimentos, produciendo la contaminación de los mismos (9, 21). En países desarrollados, el aislamiento de *L. monocytogenes* a partir de los alimentos es de notificación obligatoria, ya que no se permite la presencia del germen en ningún tipo de alimento para consumo humano. Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue comunicar el porcentaje de aislamientos de *Listeria* spp. a partir de alimentos de los denominados "listos para comer", del tipo de los embutidos secos como salami y chorizo tipo candelario.

Se obtuvieron 50 muestras al azar de salamines y 10 de chorizo tipo candelario, ubicados en góndolas de mercados habilitados para su comercialización.

Para el aislamiento, 25 g del embutido se suspendieron en 225 ml de Bleb (caldo base tamponado de enriquecimiento para listerias Oxoid CM862) y se homogeneizaron en licuadora a la mayor velocidad durante 20 s. Posteriormente se incubó a 28 °C 24 h, transfiriendo 1 ml a 9 ml de Bleb, completando la incubación hasta 48 h a la misma temperatura (2). A partir de las 2 diluciones realizadas, se sembró por duplicado mediante ansa (25 µl) en la superficie del medio sólido Palcam (Oxoid CM877). Se incubó a 37 °C durante 48 h. Las colonias que presentaban características similares a las del género *Listeria*, fueron repicadas en medio líquido tripticasa soya (Britania) para su posterior identificación (1, 2).

Los aislamientos obtenidos se observaron mediante la coloración de Gram (Britania) y por microscopía de contraste de fase. Las características fenotípicas fueron evaluadas por medio de las siguientes pruebas: movilidad a 22 °C, actividad de catalasa, bilis esculina, reducción de nitratos, utilización de carbohidratos L-ramnosa, D-xilosa, manitol, ribosa, y la prueba de CAMP (Chistie, Atkins, Much-Petersen) con las cepas patrones *Staphylococcus aureus* NCTC 1803 y *Rhodococcus equi* NCTC 1621. Como referencia se usaron las cepas ATCC 16115 *L. monocytogenes* 4b, Lm 355/

98 (H85) *L. monocytogenes* tipo 1, ATCC 33091 *L. innocua*. La serotipificación fue realizada por el A.N.L.I.S. Dr. Carlos Malbrán (1, 8, 20).

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: en salamines se aisló un total de 10 (20%) cepas de *Listeria* spp., siendo identificadas 1 (2%) cepa como *L. monocytogenes* tipo 1, 7 (14%) cepas como *L. innocua* y 2 (4%) cepas como *L. welshimeri*. En chorizos tipo candelario se aislaron 6 (60%) cepas de *Listeria* spp., siendo identificadas 2 (33%) cepas como *L. monocytogenes* tipo 1 y 4 (66%) cepas como *L. innocua*. El porcentaje total de aislamientos obtenidos en este trabajo (salamines y chorizos candelario) fue del 26,6% de las muestras con *Listeria* spp., el 5% se caracterizó como *L. monocytogenes* tipo 1, el 18,3% *L. innocua* y el 3,3% como *L. Welshimeri*.

Estos datos difieren de los obtenidos por otros autores los cuales informaron una incidencia de *L. monocytogenes* entre 12 y 17,5% (3, 4, 10). La incidencia de *L. innocua* en los embutidos estudiados no sorprende ya que diferentes autores han informado la presencia de esta bacteria en productos cárnicos (18). En el caso de *L. monocytogenes*, la colonización en los 2 tipos de embutidos no sólo puede deberse a la falta de buenas prácticas de elaboración, sino también a que los animales podrían haber estado infectados con la bacteria. Los resultados obtenidos por Johnson y col (11) en la inoculación experimental de *L. monocytogenes* en bovinos, probaron que la bacteria sobrevivía la fermentación del salame.

La carne y el tocino utilizados para la fabricación del salame y chorizo tipo candelario no se someten a tratamientos térmicos. Los ingredientes son fermentados por la flora psicrófila y mesófila natural integrada en parte por bacterias ácido-lácticas como *Lactobacillus* spp. y *Pediococcus* spp. (16). El proceso se lleva a cabo en un rango de temperatura entre 12 y 25 °C, con un pH final entre 4,8 y 5,2; actividad de agua (aw) aproximada a 0,85 (14) y con la adición de NaCl y conservantes (nitratos-nitritos) (7, 17). Esta metodología de trabajo no representa un obstáculo importante para la supervivencia del microorganismo. El efecto de la baja aw sobre las bacterias de la fermentación conllevan a que *Listeria* carezca de competencia; además, en las condiciones de conservación a temperatura ambiente,

podría incrementarse su número en forma muy peligrosa y elevar así el riesgo de producir enfermedad a los consumidores. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, se considera que se deberían realizar estudios para implementar el uso de cultivos iniciadores con bacterias ácido-lácticas productoras de bacteriocinas activas frente a *Listeria* spp. (5, 6, 13) y, además, implementar el Análisis de los Peligros y Control de los Puntos Críticos (APCPC) en los establecimientos productores de embutidos. De hecho, estos productos están al alcance y son consumidos por toda la población, inclusive por los grupos de riesgo. Por lo tanto, el control debería ser sistemático en este tipo de alimentos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración prestada por la Dra. Nélica Leardini. Servicio de Bacteriología Especial A.N.L.I.S. "Dr. Carlos Malbrán" para la clasificación de las cepas de listerias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Association of Official Analytical Chemists International AOAC (1995) Official Methods of Analysis of *Listeria monocytogenes*. Microbial methods, p. 95-115, Washington, USA.
2. Bacteriological Analytical Manual (2001) *Listeria monocytogenes*. Chapter 10:1-8. www.fda/cfsan-bam-*Listeria monocytogenes*. http://www.cfsan.fda.gov.
3. Benezet A, De la Osa JM, Botas M, Olmo N, Florez FP (1993) Investigación de la *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos. Alimentaria 247: 19-23.
4. Borges M F, Siqueira RS, Bittencourt AM, Vanetti MC, Gomide L (1999) Ocurrence of *L. monocytogenes* in salami. Rev. Microbiol. São Paulo 30: 362-364.
5. Campanini M, Pedrazzone I, Barbuti S, Baldini P (1993) Behavior of *Listeria monocytogenes* during the maturation of naturally and artificially contaminated salami: effect of lactic-acid bacteria starter cultures. Int. J. Food Microbiol. 26: 163-175.
6. Carmo CAC, Vanetti MCD (2000) Inhibition of *Listeria* growth by spices in Italian salami. I Congreso Argentino de Microbiología de los Alimentos Microal 2000, C9:50, Buenos Aires, Argentina.
7. Código Alimentario Argentino Decreto Ley 18.284 (1969) Capitulo VI Alimentos cárneos y afines, p. 306, Buenos Aires, Argentina.
8. Copes J, Pellicer K, Echeverria G, Stanchi N, Martinez C, Leardini N (2000) Investigación de *Listeria monocytogenes* en quesos de pasta blanda. Rev. Arg. Microbiol. 32:49-52.
9. Copes J, Pellicer K, Malvestiti L, Stanchi N (2000) Sobrevivencia en tablas de cocina de madera y plástico inoculadas experimentalmente con *Listeria monocytogenes*. Analecta Veterinaria 20: 47-50.
10. Dávila C (1996) Incidência de *L. monocytogenes* en productos cárnicos embutidos crudos curados producidos en apartaderos. Congreso Latino Americano de Microbiología e Higiene de los alimentos, p. 60, Lima, Perú.
11. Johnson JL, Doyle MP, Cassens RG, Schoeni JL (1988) Fate of *Listeria monocytogenes* in tissues of experimentally infected cattle and in hard salami. Appl. Environ. Microbiol. 54: 497-501.
12. Laukova C, Czikkova S, Laczkova S, Turek P (1999) Use of enterocin CCM 4231 to control *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated dry fermented Hornad salami. Int. J. Food Microbiol. 52: 115-119.
13. Leardini N, Prieto M, Martinez C, Aguerre L (2000) Investigación de serovariedades de *Listeria monocytogenes* en alimentos de orígenes diversos. I Congreso Argentino de Microbiología de los Alimentos Microal 2000, C18: 59, Buenos Aires, Argentina.
14. Pini PN, Gilbert RJ, (1998) The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. Int. J. Food Microbiol. 6: 317-326.
15. Pitt W, Harden T, Hull R (1999) *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Austr. J. Dairy Technol. 54 : 49-65.
16. Santos EM, Gonzalez-Fernandez C, Jaime L, Rovira J (1998) Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of "Chorizo". Int. J. Food Microbiol. 39: 123-128.
17. Sanz Y, Vila R, Toldra F, Nieto P, Flores J (1997) Effect of nitrate and nitrite curing salts on microbial changes and sensory quality of rapid ripened sausages. Int. J. Food Microbiol. 37: 225-229.
18. Schuchat A., Swaminathan B, Broome CV (1991) Epidemiology of human listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 169-183.
19. Simon Serra M, Tarrago Asamara C, Ferrer Escobar MD (1992) Estudio de bacterias patógenas en embutidos. An. Bromatol. 44: 109-112.
20. Tobia M, Mengoni G, Pellón H (1997) *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp en productos termoprocesados. Rev. Arg. Microbiol. 29: 109-113.
21. Tompkin R, Scott V, Bernard D, Sveum W, Gombas K (1999) Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. Dairy, Food and Environmental Sanitation 19: 551-562.