

Artículo Original

Formación de biopelículas y su resistencia frente a dos desinfectantes en *Listeria monocytogenes* aisladas de embutidos y superficies**Biofilm formation and resistance against two disinfectants in *Listeria monocytogenes* isolated sausages and surfaces**Nilda A. Castro^{1*}, María E. Salazar²

* Autor para correspondencia

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica.² Universidad nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología "Marco A. Garrido Malo"

Nilda A. Castro. Email: ncastroamaro44@gmail.com

María E. Salazar. Email: msalazars@unmsm.edu.pe

Resumen

Listeria monocytogenes es un microorganismo patógeno con capacidad de formar biopelículas en el ambiente de producción de alimentos, siendo difícil su remoción con los procedimientos normales de limpieza y desinfección. En el presente estudio, se evaluó la capacidad de formación de biopelículas de 20 cepas de *L. monocytogenes* aisladas de embutidos y superficies inertes de una planta de procesamiento cárnicos. La detección se realizó con GeneQuence Test y la capacidad de formación de biopelículas por el método de Djordjevic a 620nm. Se evaluó diferentes condiciones de temperatura: refrigeración (4°C), ambiente (22°C) y 35°C, obteniendo formación de biopelículas en el 95% de las cepas según la clasificación Stepanovic. El 85% fueron productoras débiles de biopelícula a 4°C y 35°C; sin embargo a 35°C un 10% fueron productoras moderadas. La resistencia frente a dos desinfectantes a base de hipoclorito de sodio y amonio cuaternario se evaluó en tres tiempos de contacto (5, 10 y 30 minutos), demostrando que el hipoclorito de sodio es más eficiente para eliminar la biopelícula a partir de los 30 minutos de exposición.

Palabras clave: *Listeria monocytogenes*; biopelículas; desinfectantes.

Summary

Listeria monocytogenes is a pathogenic microorganism capable of forming biofilms in the food production environment, being difficult to remove with normal cleaning and disinfection procedures. In the present study, was to evaluate the biofilm formation capacity of 20 strains of *Listeria monocytogenes* isolated from sausages and inert surfaces of a meat-processing plant. Detection of the bacteria was done using GeneQuence Test and the ability of biofilm formation was determined by the Djordjevic method at 620nm. Different temperatures conditions were evaluated: refrigeration (4 °C), ambient (22 °C) and 35 °C, and it was obtained that 95% of the strains have the capacity to form biofilm for Stepanovic's recommendations. The weak biofilm producing strains were 85% at 4 °C and 35 °C; however at 35 °C 10% were moderate producer. Resistance to two disinfectants based on sodium hypochlorite and quaternary ammonium was evaluated in three contact times (5, 10 and 30 minutes), demonstrating that sodium hypochlorite is more efficient than quaternary ammonium to remove the biofilm from 30 minutes of exposure.

Key Words: *Listeria monocytogenes*; biofilm; disinfectants.

Correspondencia:

Nombre: Nilda A. Castro

Dirección: Jr. Puno 1002 Lima.

Recibido: 22/06/2017

Aceptado: 27/09/2017

Citar como:

Castro N, Salazar M. Formación de biopelículas y su resistencia frente a dos desinfectantes en *Listeria monocytogenes* aisladas de em-butidos y superficies. Ciencia e Investigación 2017 20(1):15-20.

© Los autores. Este artículo es publicado por la Ciencia e Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución - No Comercia _Compartir Igual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>) que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada.

INTRODUCCIÓN

Las biopelículas son organizaciones microbianas compuestas por microorganismos que se adhieren a diversas superficies, proporcionando protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana, por lo que representa una estrategia de supervivencia. Por ello, su estudio se hace cada vez más extenso y complejo, relacionándose con áreas como la medicina, industria alimentaria y medio ambiente¹.

Listeria monocytogenes es un patógeno emergente de origen alimentario y responsable de la listeriosis, una enfermedad relevante en salud pública debido al impacto social-económico que tiene y a la gravedad del cuadro clínico, presentando una tasa de morbilidad baja pero una tasa de mortalidad de 20-30%. Este patógeno es capaz de crecer en distintas superficies relacionadas con el ambiente de producción alimentario, con la facultad de adherirse a las superficies y formar biopelículas².

La listeriosis es consecuencia de hábitos alimentarios, el incremento de las poblaciones en riesgo; los cambios importantes en la producción, procesamiento y distribución de los alimentos; además de la globalización de los mercados y el comercio internacional³. Los brotes se originan principalmente por prácticas higiénicas inadecuadas, contaminaciones cruzadas, contaminación bacteriana desde las superficies de contacto y de los equipos, las materias primas y la transmisión por vectores⁴.

En los últimos años los avances tecnológicos han permitido extender la vida útil de los productos refrigerados, aumentando el riesgo potencial de contaminación con *Listeria monocytogenes*. Los alimentos listos para consumir (LPC) adquieren gran importancia en la epidemiología de brotes de listeriosis alimentaria, pues van a ser sometidos a tratamientos de esterilización durante su fabricación, no obstante, previamente al envasado, son manipulados, entrando en contacto con distintas superficies y/o maquinarias, favoreciendo la contaminación de los mismos⁵.

Es fundamental que se utilicen mecanismos de prevención y control para minimizar la incidencia del microorganismo y la contaminación cruzada en la materia prima, producto terminado, superficies, equipos e instalaciones que estén en contacto directo con los alimentos, sobre todo en aquellos LPC. Una forma de minimizar el riesgo de contaminación, es por medio de un plan de saneamiento específico que incluya programas de limpieza y desinfección⁶.

Teniendo en cuenta que *Listeria monocytogenes* se puede presentar en las plantas procesadoras de alimentos, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la formación de biopelículas de *Listeria monocytogenes* y su resistencia frente a dos desinfectantes, con principios activos a base de hipoclorito de sodio y amonio cuaternario en una planta de procesado cárnico en Lima.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enriquecimiento de las muestras

Se muestrearon 426 embutidos (115 cocidos, 205 precocidos y 106 crudos) y se realizaron 252 hisopados de superficies de una planta de procesados cárnicos en Chorrillos, durante los años 2013 y 2014. El método de enriquecimiento empleado fue el recomendado por USDA/FSIS⁷.

De alimento procesado: Se pesó 25 g en 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria* UVM (University Vermont) y se incubó a 30°C por 24 horas. Se transfirió 0,1 mL a 10 mL de Caldo Palcam y se incubó a 35°C por 48 h.

De superficies: Se realizó con hisopos 3M conteniendo caldo Lethen, luego se colocaron en 10mL de Caldo UVM y se incubaron a 30°C por 24 h. Se transfirió 0,1 mL a 10 mL de Caldo Palcam y se incubaron a 35°C por 48 h.

Detección de *Listeria monocytogenes*

Se usó la técnica de hibridación de ADN mediante el kit GeneQuence *Listeria monocytogenes*. Para ello, se transfirieron a tubos estériles 0,4 mL del caldo Palcam y los controles del GeneQuence Test. Luego se adicionó 0,2 mL de la solución Pretratamiento/Lisis, y se incubó a 37°C por 5 min. En la microplaca de poliestireno se colocaron 150 uL de las muestras lisadas. Se agregó 125 uL de la solución de Hibridización/Sonda, se mezcló e incubó a 45°C por 1 h. Cada pocillo fue enjuagado 5 veces con solución de lavado, se secó y adicionó 150 uL del substrato cromógeno. Se incubó a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente se agregó 50 uL del stop y se midió la absorbancia a 450 nm en el espectrofotómetro.

Aislamiento de *Listeria monocytogenes*

Las muestras positivas a *Listeria monocytogenes* se sembraron en agar Palcam e incubaron a 35°C por 48 h. Las colonias presuntivas se aislaron en TSA para realizar: Tinción Gram, Catalasa, Movilidad, Hemólisis y Test de CAMP⁸.

Ensayo de producción de biopelículas

La capacidad de producción de biopelículas se realizó según el método descrito por Djordjevic⁹. Para ello se activaron las cepas en caldo cerebro-corazón (BHI) a 0,5 de turbidez en la escala de Mc Farland y se transfirieron 100 uL de dicho caldo a microplacas; estas se incubaron a temperaturas de refrigeración (4°C) por 7 días, ambiental (22°C) por 48 horas y de 35°C por 24 horas. La absorbancia del crecimiento bacteriano fue medido a 620 nm, se lavó cada pocillo con agua destilada estéril y secada al medio ambiente durante 45 minutos. La tinción de los pocillos se realizó con 150 uL de cristal violeta al 1% por 45 minutos. El análisis cuantitativo de la producción de biopelícula se realizó agregando 200 uL de etanol al 96% por 45 min. Luego se transfirieron 100 uL de cada pocillo a una nueva microplaca para la lectura de la absorban-

cia a 620 nm en el espectrofotómetro. Se consideró como control positivo a *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 y como control negativo el caldo BHI sin inocular.

Determinación de la capacidad de producción de biopelícula

La clasificación de cepas de *Listeria monocytogenes* formadoras de biopelículas fue definido por Stepanovic¹⁰, según la densidad óptica del punto de corte (DOC). El DOC se obtuvo del promedio de las densidades ópticas (DO) de los controles negativos más 3 desviaciones estándar, clasificando a las cepas: No productoras: $X < \text{DOC}$, Productoras débiles: $\text{DOC} < X < 2\text{DOC}$, moderadas: $\text{DOC} < X < 4\text{DOC}$ y fuertes: $X > 4\text{DOC}$.

Evaluación de la actividad desinfectante

Las soluciones de los desinfectantes evaluados con principios activos a base de hipoclorito de sodio (200ppm) y amonio cuaternario (5ml/L) se prepararon teniendo en cuenta las diluciones usadas en planta, usando agua ozmotizada como diluyente.

Las cepas se diluyeron en caldo BHI ajustando la turbidez a 0,5 en la escala de Mc Farland y se transfieren 100 uL de estas a microplacas. Se incubaron a las temperatura de prueba (4°, 22° y 35°C) por 7 días, 48 y 24 hrs. respectivamente. Para la evaluación desinfectante se eliminó el contenido de las microplacas y se adicionó 100 uL de cada solución desinfectante, manteniendo un tiempo de contacto de 5, 10 y 30 minutos. Luego las microplacas se lavaron con agua destilada estéril y se secaron al medio ambiente durante 45 minutos. Posteriormente se realizó el procedimiento antes mencionado, desde la tinción con cristal violeta hasta la medida de la absorbancia a 620 nm¹¹.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados fue analizado empleando la prueba ANOVA de un factor, mediante el programa SPSS Statistics 23.0 con la finalidad de determinar diferencias significativas ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Cepas de *Listeria monocytogenes*

Se obtuvo 39/426 de incidencia para *Listeria monocytogenes* en embutidos y 24/252 en superficies. Se seleccionaron 20 cepas positivas: 10 de embutidos y 10 de superficies inertes.

Clasificación de la capacidad de formación de biopelículas

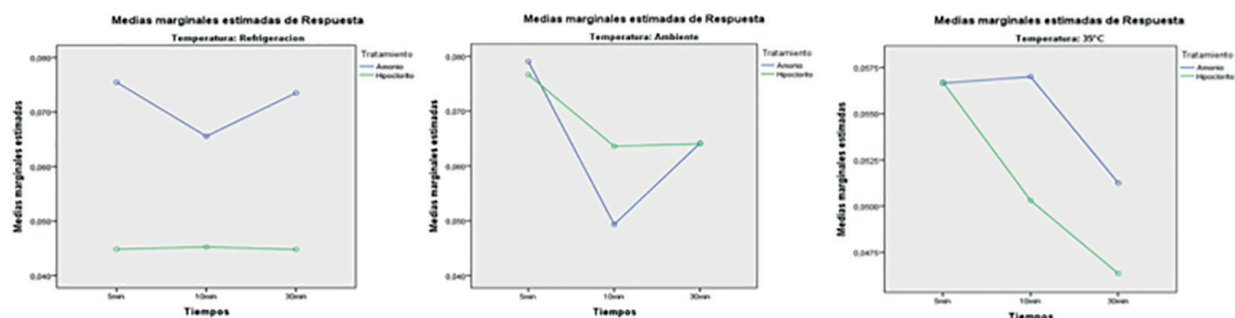
El 95% de las cepas tienen capacidad de producir biopelículas en las temperaturas evaluadas, sin embargo ninguna de las cepas fue clasificada como fuerte productora de biopelícula. A refrigeración (4°C) se obtuvo 3/20 cepas no productora de biopelícula (15%) y 17/20 cepas productora débiles (85%). A temperatura ambiental (22°C) se obtuvo 1/20 de cepas no productoras de biopelícula (5%) y 19/20 cepas productoras débiles (95%). En la evaluación a 35°C, se obtuvo 1/20 cepas no productora de biopelícula (5%), 17/20 cepas productoras débiles (85%) y 2/20 cepas productoras moderadas (10%).

Tabla 1. Porcentaje de producción de biopelículas de *Listeria monocytogenes* a las temperaturas evaluadas.

PRODUCCIÓN DE BIOPELICULA	Temperatura Refrigeración	Temperatura Ambiental	Temperatura 35°C
No productora	3 (15%)	1 (5%)	1(5%)
Productora Débil	17 (85%)	19 (95%)	17 (85%)
Productora Moderada	0(0%)	0(0%)	2 (10%)
Productora Fuerte	0(0%)	0(0%)	0(0%)

Evaluación de la actividad desinfectante

La evaluación de la actividad desinfectante se realizó de manera independiente por temperatura, para determinar si existe diferencia entre los tratamientos (Amonio cuaternario e Hipoclorito de sodio). A 4°C, encontramos que existe diferencia en la formación de biopelículas entre los tratamientos. A 22°C y 35°C el tiempo adecuado para la reducción de biopelícula es mayor a 30 minutos. Además se observa que el hipoclorito de sodio reduce mejor la formación de biopelícula que el amonio cuaternario.



Gráfica 1. Valores promedios de la producción de biopelícula después del tratamiento con Hipoclorito de sodio y Amonio cuaternario a diferentes temperaturas

DISCUSION DE LOS RESULTADOS

Listeria monocytogenes es ubicuo en la naturaleza, pudiendo sobrevivir y crecer en el ambiente y las líneas de producción alimentaria, especialmente en equipos y áreas que son difíciles de limpiar. Los estudios microbiológicos indican que está presente en una variedad de alimentos, incluyendo productos cárnicos. Suele encontrarse en productos crudos e incluso el riesgo es más alto si se relacionan con los LPC, con un tiempo de almacenamiento prolongado y que han sido contaminados con el patógeno post procesamiento¹².

En el presente estudio se encontró 9,15% de incidencia para *Listeria monocytogenes* en embutidos, siendo relativamente alto en los productos crudos (30,19%), cocidos (2,61%) y bajo en precocidos (1,95%). Para superficies inertes la incidencia fue de 9,52%. Estos resultados difieren de los obtenidos por Centurión¹³ en muestras de pollo cuya incidencia fue de 2% y Pérez¹⁴ obtuvo 78% de incidencia en salchichas tipo huacho. Sin embargo coinciden con los obtenidos por Alsheikh¹⁵ en salchichas, mortadela, hamburguesas y pollos, con un 13,6% de positivos a *Listeria monocytogenes* en Sudán y por Barrientos¹⁶ con 11,4 % en canales de cerdo en Lima.

El estudio de las biopelículas formadas por *Listeria monocytogenes* se realizó con la finalidad de aislar cepas potenciales y conocer su comportamiento a diferentes condiciones ambientales y frente a desinfectantes usados en la planta. Se obtuvo que el 95% de las cepas tienen una alta capacidad de producir biopelícula en las 3 temperaturas evaluadas; sin embargo hubo diferencias respecto a la capacidad de formación de biopelícula. Cabe resaltar que el medio de cultivo y la temperatura a 35°C ayudan a expresar cepas formadoras moderadas de biopelícula. Dichos resultados coinciden con las investigaciones de Carrillo² y Villanueva⁸ en las que el BHI permite la expresión de una cantidad de formadores moderados de biopelícula. Purkrtova¹¹ menciona que el tipo de medio de cultivo es determinante para la producción de biopelícula¹¹.

Por otro lado, las cepas aisladas de alimentos se comportan como productoras débiles, mientras que para superficies inertes se permitió la expresión de cepas productoras moderadas a 35°C. En el presente estudio se observa la influencia de la temperatura sobre la formación de biopelícula ya que existen diferencias estadísticamente significativas entre ellas ($p < 0,05$), siendo mayor a 35°C, y menor a 22°C. Según Carrillo² coincide con obtener formadores moderados a 35°C y ninguna cepa fuertemente productora. Villanueva⁸ obtiene 14,29% de cepas formadoras moderadas, 50% de formadoras débiles y 35,71% no tiene capacidad para formar biopelícula a 32°C.

Las cepas aisladas de superficies y con formación moderada de biopelícula, generan un riesgo de contaminación al alimento, sobre todo en aquellos LPC y que se contaminan post procesamiento térmico. Sánchez¹⁷ detectó *Listeria monocytogenes* en puntos críticos establecidos en una planta procesadora de consumo rápido, hallando

una prevalencia baja (1%) en carne para hamburguesa y consideró que el eslabón de la cadena de transmisión son las superficies inertes que entran en contacto con los alimentos y que deben ser considerados como un punto crítico de control.

La evaluación de hipoclorito de sodio y amonio cuaternario se realizó de manera individual por temperaturas, con el fin de apreciar diferencias entre ellas. A 4°C no existe diferencia en los tiempos evaluados (1, 5 y 30 minutos), sin embargo el hipoclorito de sodio reduce mejor la formación de biopelícula. A 22°C y 35°C ambos tratamientos son efectivos para reducir la biopelícula a partir de los 30 minutos, sin embargo la mejor reducción de biopelícula se observa con el hipoclorito de sodio. Los trabajos realizados por Rojas¹⁸ mencionan que el amonio cuaternario e hipoclorito de sodio, fueron efectivas para eliminar células planctónicas de *Listeria monocytogenes*, con una inhibición del 100% a 5, 10 y 15 minutos¹⁸. Los resultados del presente estudio coinciden con Purkrtova¹¹ en cuanto a la disminución de formación de la biopelícula a los 30 minutos luego del tratamiento; sin embargo el amonio cuaternario es más eficiente. Jeyasekaran¹⁹ evalúa el efecto de sanitizantes sobre la biopelícula de *Listeria monocytogenes* en superficies de metal y plástico; obteniendo que el hipoclorito de sodio a 100 ppm es más efectivo para inactivar la biopelícula, siendo mejor la reducción en la superficie de metal.

Los programas HACCP y BPM para la producción de alimentos son prioritarios^{20, 21}, sin embargo estas medidas de control no son suficientes en la planta. Por ello son importantes los programas de monitoreo microbiológicos en los puntos potenciales de contaminación, con el objetivo de evaluar la efectividad de la limpieza y desinfección.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Betancourth M., Boreto J., Rivera S. Biopelículas: Una comunidad microscópica en desarrollo. Colomb Med. 2004; 35(1): 34-39.
2. Carrillo G, Redondo M, Arias ML. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de queso tierno de origen costarricense. Arch Latinoam Nutr. 2010; 60(2): 175-178.
3. Muñoz A, Vargas M, Díaz G, Guzmán, V. Presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo, procedentes de plazas de mercados y delicatessen en supermercados de cadena, Bogotá, D.C., 2002-2008. Biomédica. 2011; 31: 428-439.
4. Marzocca M, Marucci P, Sica M, Álvarez E. Detección de *Listeria monocytogenes* en distintos productos alimenticios y en muestras ambientales de una amplia cadena de supermercados de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). Rev Argent Microbiol. 2004; 36: 179-181.
5. González C, Sánchez E, Padalino M, Frontela C. Efecto de distintos antimicrobianos sobre el crecimiento de *Listeria monocytogenes*. An Vet (Murcia). 2011; 27: 33-42.

6. Michanie S. *Listeria monocytogenes*: La bacteria emergente de los 80. Revista Ganados y Carnes, 2004; 5: 1-8. Buenos Aires. Argentina.
7. USDA-FSIS. Isolation and identification of from red meat, poultry, egg and environmental samples. Microbiology Laboratory Guidebook, 2005; cap 8.
8. Villanueva DA. Capacidad de formación de biopelículas de cepas de aisladas de quesos frescos procedentes de mercados del cercado de Lima. [Tesis para optar título de Químico-Farmacéutico]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2015.
9. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough L. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(6): 2950-2958.
10. Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Lett Appl Microbiol. 2004; 38:428-432.
11. Purkrťová S, Turonová H, Pilchová T, Demnerová K, Pazlarová J. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Disinfectants. Czech J Food Sci. 2010; 28(4): 326-332.
12. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Organización Mundial de la Salud. Documento sobre el control de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Programa FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Comité del Codex sobre Higiene de los Alimentos, 1999.
13. Centurion M, Takajara M. Determinación de la incidencia de *Listeria monocytogenes* en pollos frescos y verduras frescas obtenidos en mercados y centros de abastecimiento de Lima metropolitana. [Tesis para optar el título de Químico-Farmacéutico]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2004.
14. Pérez ME. Prevalencia de *Listeria Monocytogenes* en salchichas tipo Huacho provenientes de los mercados de abastos del Cercado de Lima. [Tesis para optar el grado académico de Magíster en Ciencia de los Alimentos]. Lima-Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2013.
15. Alsheikh A, Mohammed G, Abdalla M. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from retail broiler chicken ready to eat meat products in Sudan. Int J Anim Vet Adv. 2013; 5(1): 9-14.
16. Barrientos E., Lucas R., Ramos D., Rebatta M., Arbaiza T. Presencia de en canales porcinas en Lima, Perú. Rev. Investig Vet Perú. 2015; 26(1): 135-139.
17. Sánchez FJ. Detección *Listeria monocytogenes* y *Listeria* sp en puntos críticos establecidos en una planta procesadora de productos congelados para rápido consumo. [Tesis de Magister]. San Nicolás de los Garza-México: Universidad Autónoma de Nuevo León, 2003.
18. Rojas C. Evaluación de cuatro desinfectantes sobre *Listeria monocytogenes* aislada de productos cárnicos de una planta de procesados en Bogotá. [Tesis para optar el título de Microbiólogo Industrial]. Bogotá-Colombia: Pontificia Universidad Javeriana, 2007.
19. Jeyasekaran G, Karunasagar I. Effect of Sanitizers on *Listeria* Biofilm on Contact Surfaces. Asian Fish Sci. 2000; 13: 209-213.
20. López V, Suárez M, Chico-Calero I, Navas J, Martínez-Suárez J. *Listeria monocytogenes* en alimentos: ¿son todos los aislamientos igual de virulentos? Rev Argent Microbiol. 2006; 38: 224-234.
21. Myszkka K, Czaczky K. Bacterial biofilms on food contact surfaces. Pol J Food Nutr. Sci. 2011; 61(3): 173-180.

