

PREVALENCIA DE *Listeria monocytogenes* EN SALCHICHAS TIPO HUACHO PROVENIENTES DE LOS MERCADOS DE ABASTO DEL CERCADO DE LIMA

The prevalence of *Listeria monocytogenes* in Huacho sausages from some markets in Cercado de Lima

María E. Pérez¹, María E. Salazar², Gerardo Gamarra³

¹Ministerio de Salud, ²Instituto de Investigaciones en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco Antonio Garrido Malo”, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UNMSM

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia de la bacteria *Listeria monocytogenes*. Para ello, se analizaron 60 muestras de salchicha tipo Huacho de cinco mercados de abasto del Cercado de Lima, que se procesaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, dentro de las 24 horas de su recolección. Se utilizó la metodología USDA-FSIS, en sus tres fases: pre-enriquecimiento, enriquecimiento de la muestra y siembra en agares selectivos y prueba de CAMP. Los resultados mostraron que la prevalencia de esta bacteria en las salchichas tipo Huacho es de 78%. Se concluye que este producto podría constituir un alimento de riesgo potencial para la salud pública.

Palabras clave: *L. monocytogenes*, Agar Oxford, salchicha tipo Huacho, CAMP.

SUMMARY

Sixty Huacho sausage samples from Food Markets in Cercado de Lima, Peru, were analyzed in order to determine the prevalence of *Listeria monocytogenes*. These samples were collected in sterile containers and refrigerated, to be processed within 24 hours since collection in Microbiology laboratory from Pharmacy faculty of National University of San Marcos. The USDA-FSIS methodology was used for microbiological analysis, which consists of three phases: Pre-enrichment of sample, Sample enrichment and Reseeding on selective agars and CAMP test. *Listeria monocytogenes* prevalence in Huacho sausages, was 78%. These results support that Huacho sausage is a food with a potential risk to the public health.

Keywords: *L. monocytogenes*, Agar Oxford, sausage type Huacho, CAMP.

INTRODUCCIÓN

L*isteria monocytogenes* es un patógeno Gram positivo intracelular y agente etiológico de la listeriosis, enfermedad transmitida a los humanos a través de los alimentos, que afecta principalmente a gestantes, neonatos, ancianos, pacientes con cáncer, infectados con VIH, usuarios de corticoides y trasplantados, entre otros ⁽⁴⁾, y que es potencialmente fatal para ciertos grupos de riesgo ^(1,2). La virulencia de *L. monocytogenes* se debe a que presenta un ciclo de vida intracelular altamente complejo y coordinado, que comprende varios pasos cruciales: adhesión a la célula huésped, invasión, motilidad, así como la multiplicación y propagación intercelular. El final de cada etapa depende de la actividad de factores bacterianos especializados estrechamente controlados, a su vez, por un conjunto específico de reguladores ⁽³⁾. La listeriolisina O (LLO) es un factor de virulencia importante, pues ha demostrado ser crucial para el

escape bacteriano de la internalización en la vacuola después de su entrada en las células. Actualmente, se está revisando el papel de la LLO durante la infección y revelando nuevos conocimientos sobre su acción, en particular antes de la entrada de esta bacteria a la célula ⁽⁵⁾.

Listeria monocytogenes puede persistir en los equipos de la industria alimentaria y en las superficies de los locales, en particular a baja temperatura. Los estudios científicos, se han centrado en el potencial de adherencia y en la capacidad de formación de biopelícula, así como en la arquitectura, resistencia a la desecación, al ácido, calor, tolerancia al aumento de la concentración sub-letal de desinfectantes o resistencia a concentraciones letales ^(6,7,8).

Listeria spp, se aísla de una diversidad de fuentes ambientales, incluyendo el suelo, agua, efluentes, alimentos, heces de seres humanos y animales. La capacidad de esta bacteria para sobrevivir en ambientes ricos en bilis y para inducir el agotamiento

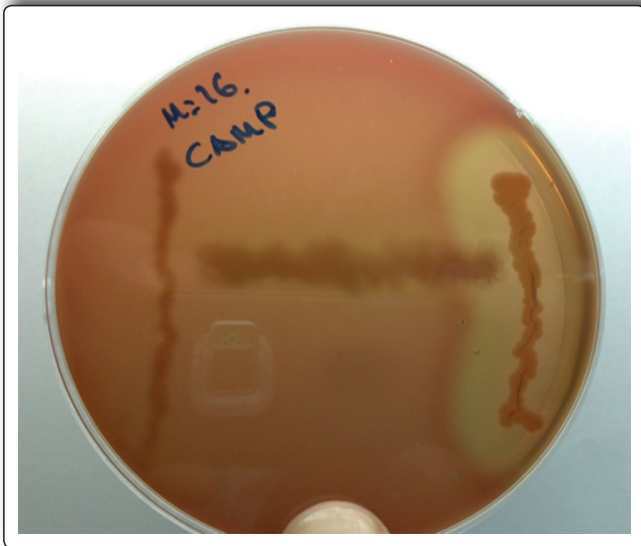


Figura 1. Prueba de CAMP (Christie - Atkins - Munch - Peterson).

de las células centinela, tales como las células de Paneth, que monitorean la carga luminal de bacterias comensales, sugiere estrategias que han evolucionado para promover su supervivencia intestinal⁽⁹⁾.

En el Perú, la listeriosis no se documenta de manera sistemática; sin embargo, en otros países, como Estados Unidos, se estima 12 casos por cada cien mil gestantes y 8,6 casos por cada 100 mil nacidos vivos, con una reducción progresiva de casos debido a las estrictas políticas de salubridad impuestas en la industria de alimentos y por la sensibilización de la población respecto al tema⁽¹⁰⁾.

Listeria monocytogenes es una seria amenaza para la salud pública. La mayoría de los casos de listeriosis humana está asociada con los alimentos contaminados. Se necesitan sistemas de vigilancia microbiológica confiables para el control de patógenos, efectivas para la industria alimentaria y las autoridades competentes⁽¹¹⁾.

Se sabe que la dosis infecciosa de *L. monocytogenes* es de, al menos, 10^2 células viables en el caso de los grupos de riesgo, y que esta cifra aumenta hasta 10^4 en el caso de la población sana⁽¹²⁾.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras

Se tomaron 60 muestras de salchicha tipo Huacho de mercados de abasto del Cercado de Lima seleccionados aleatoriamente, de las cuales 12 pertenecían al Mercado Central, 12 al mercado La

Aurora, 12 al mercado Santa Rosa, 12 al mercado Elio y 12 al mercado San Idelfonso. Fueron recolectadas desde noviembre de 2011 a abril de 2012, siendo llevadas al laboratorio de microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, en recipientes estériles, refrigerados, donde fueron procesadas dentro de las 24 horas de colectadas.

Homogeneización de las muestras

Bajo condiciones de asepsia (uso de guantes, mascarilla, gorro y próximo a la llama de un mechero Bunsen), las muestras recolectadas se homogeneizaron por trituración con un mortero estéril para proceder a su respectivo análisis microbiológico.

Análisis Microbiológico

Se realizó mediante la metodología de USDA-FSIS⁽¹³⁾.

Enriquecimiento Selectivo

Se tomaron 25 gramos de cada muestra, luego se añadieron 225 mL de caldo de enriquecimiento "ONE Broth-Listeria Base CM1066", que contiene el suplemento selectivo "ONE Broth-Listeria Selective Supplement". Posteriormente se incubaron las muestras durante 48 horas a 35°C.

Aislamiento Selectivo

Después del enriquecimiento, se procedió a sembrar en el medio Agar base Listeria selectiva (Oxford formulation) CM0856, que contiene un suplemento selectivo "Listeria selective Supplement (Oxford formulation)" y se incubó a 35°C, durante 48 horas. Luego de este tiempo, se identificaron a las positivas (enriquecimiento de la colonia), a las cuales se resembró en el mismo medio para mejor observación macroscópica e identificación bioquímica.

Conservación de cepas

Las colonias sospechosas se incubaron después en agar tripticosa soya (TSA) durante 48 horas a 35°C. Luego de este tiempo, se conservaron a temperatura de refrigeración para posteriormente proceder con el análisis bioquímico.

Identificación bioquímica

Se realizó la prueba de hidrólisis de la esculina y la diferenciación bioquímica tomando como referencia el Manual de Bacteriología Analítica⁽¹⁴⁾.

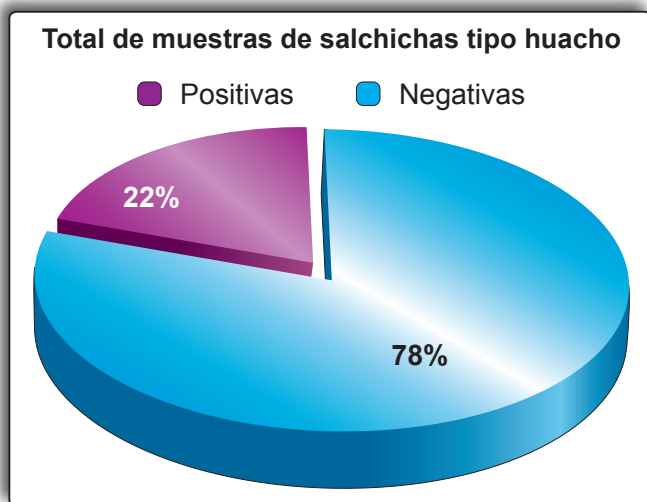


Figura 2. Porcentaje total de muestras de salchichas tipo Huacho que dieron positivo al aislamiento de *Listeria monocytogenes*.

Morfología microscópica

Se determinó a través de la tinción Gram.

Prueba de la catalasa

Se realizó para comprobar la presencia de la enzima catalasa mediante la adición de peróxido de hidrógeno.

Uso de carbohidratos

Se inoculó puntura, tomada del vial, a tubos que contenían medio semisólido rojo fenol caseína peptona, cada uno de los cuales contenía, además, 0,5% de uno de los siguientes azúcares: manitol, maltosa, ramnosa, glucosa, xilosa y esculina. Se incubó a 35°C por 48 horas.

Reducción de nitratos

La cepa se inoculó en caldo nitrato e incubó a 35°C por 5 días. Se adicionó el reactivo de Gries, y después de 30 segundos, al no observar desarrollo de color, se agregó polvo de zinc. Se observó una coloración roja como indicativo de resultado negativo.

Movilidad

Se sembró por puntura en medio (SIM) e incubó a temperatura ambiente por 7 días, para luego apreciar la movilidad que se desarrolló dando la forma de un paraguas.

Hemólisis

A partir del agar selectivo OXFORD, se sembró en agar sangre de carnero al 5% y se incubó 48 horas a 35°C y se observó la naturaleza de la hemólisis.

Prueba del CAMP (Reacción de Christie, Atkins Munch-Peterson)

Se sembró por estría, en línea recta, una cepa de *Staphylococcus aureus* β-toxigénico sobre agar sangre de carnero, paralelamente se sembró por estría una cepa de *Rhodococcus equi*. Las cepas de prueba se sembraron en forma transversal a las estrías de *Staphylococcus aureus* y *Rhodococcus equi* pero sin tocarlas, es decir con 1 o 2 mm de separación. Las placas se incubaron por 24 - 48 h a 35°C. Este test permitió diferenciar las especies de *Listeria* ⁽¹⁵⁾.

RESULTADOS

Se identificaron 47 cepas de *Listeria monocytogenes*, aisladas a partir de 60 muestras de salchichas tipo Huacho expendidas en los mercados del Cercado de Lima. De las 12 muestras procedentes del Mercado Central 10 resultaron positivas; de las 12 muestras del Mercado La Aurora, todas fueron positivas; de las 12 muestras del Mercado Santa Rosa 09 resultaron positivas; de las 12 muestras procedentes del Mercado Elio 09 resultaron positivas y de las 12 muestras procedentes del Mercado San Idelfonso 07 resultaron positivas (Figura 1 y 2).

DISCUSIÓN

Este estudio permitió obtener una prevalencia de 78% de *Listeria monocytogenes* en salchichas tipo Huacho provenientes de mercados de abasto del Cercado de Lima. La presencia de esta bacteria

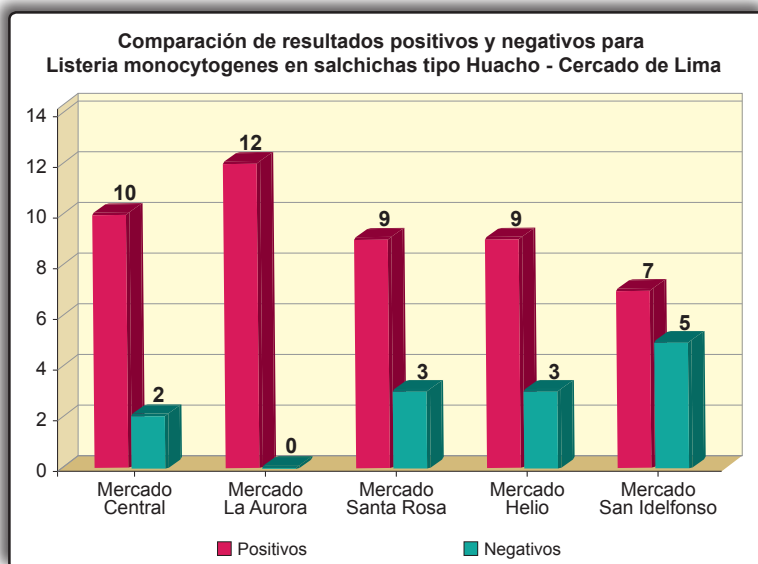


Figura 3. Comparación de resultados positivos - negativos para *Listeria monocytogenes* en salchicha tipo Huacho por mercado.

podría tener diverso origen, desde materias primas contaminadas durante el proceso de matanza y desposte, hasta prácticas higiénicas deficientes durante el proceso de manufactura. También se debe considerar que esta bacteria se relaciona con alimentos listos para el consumo que se conservan refrigerados por un periodo prolongado de tiempo.

Se conoce que las condiciones de producción de este alimento, se realiza de forma tradicional, con métodos transmitidos de generación en generación. Por tanto, durante el procesamiento, almacenamiento y distribución, no se tienen en cuenta las Buenas Prácticas de Manufactura.

En Brasil, Monteiro y col, analizaron 30 muestras de salchicha, aislando, en el 6,7% de ellas, *L. monocytogenes* (serotipos 1/2a y 1/2b) ⁽¹⁶⁾.

Villegas y col, de un total de 18 casos de listeriosis perinatal, procedentes del Hospital San Bartolomé de Lima, Perú, durante los años 2001 al 2005, se obtuvieron 20 cepas de *L. monocytogenes*, con seis genotipos diferentes, siendo el RAPD tipo A-I, el más frecuente con el 40% (8/20) de las cepas estudiadas ⁽¹⁰⁾.

Pérez, de un total de 240 muestras, obtenidas en forma proporcional –en los mercados de abasto de Palermo, La Unión y La Hermelinda, según la Norma Técnica Peruana NTP ISO 2859–, *L. monocytogenes* estuvo presente en un 25,4%; 10,4% en tomate; 31,3% en zanahoria; 23,0% en espinaca; 29,2% en lechuga y 33,3% en rabanito. Asimismo, determinó que el 57% de los puestos de venta expenden hortalizas en mal estado de conservación, el 84% de los manipuladores de hortalizas no aplican las buenas prácticas de manipulación, el 81% de manipuladores no cumplen con las reglas higiénicas personales y el 77% de los puestos de venta de hortalizas presentan condiciones higiénicas sanitarias no aceptables ⁽¹⁷⁾.

De los resultados obtenidos, con ayuda de procedimientos microbiológicos, se puede inferir que la presencia de *Listeria monocytogenes* en salchicha tipo Huacho, se debe a la no adición de conservantes y especias, deficiencias en la cadena de frío y la inadecuada manipulación posterior a la producción, todos ellos factores que influyen notoriamente en el establecimiento y multiplicación de la bacteria.

CONCLUSIONES

Se aislaron 47 cepas de *L. monocytogenes* a partir de 60 muestras de salchicha tipo Huacho procedentes de cinco mercados de abastos del Cercado de Lima.

Así en el Mercado Central 84% fueron positivas, del Mercado La Aurora el 100%, del Mercado Santa Rosa el 75%, del Mercado Elio el 75% y del Mercado San Idelfonso el 58%.

Lasepas de *Listeria monocytogenes* se identificaron con pruebas bacteriológicas convencionales, como: presencia B-hemolisis, reacción de CAMP positiva y pruebas de identificación bioquímica que consideraron a los carbohidratos D-xilosa, D-manitol, L-ramnosa, D-maltosa, esculina y D-glucosa.

Los resultados reflejan que las salchichas tipo Huacho son vehículos de transmisión de la mencionada bacteria, convirtiéndose en un alimento de alto riesgo, que debe ser controlado y cuyo procesamiento debe ser mejorado por la autoridad competente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lamont RF, Sobel J, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Vaisbuch E. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *J Perinat Med* 2011; 39(3): 227-36.
- Smith J, Liu Y, Paoli G. How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? *Can J Microbiol* 2013; 59 (3): 141-52.
- Hamon MA, Ribet D, Stavru F, Cossart P. Listeriolysin O: the Swiss army knife of *Listeria*. *Trends Microbiol* 2012; 20(8): 360-8.
- Renier S, Hébraud M, Desvaux M. Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram positive foodborne pathogen. *Environ Microbiol* 2011; 13(4): 835-50.
- Hoelzer K, Pouillot R, Dennis S. *Listeria monocytogenes* growth dynamics on produce: a review of the available data for predictive modeling. *Foodborne Pathog Dis* 2012; 9(7): 661-73.
- Lungu B, Ricke SC, Johnson MG. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: a review. *Anaerobe* 2009; 15(1-2): 7-17.
- Orsi RH, den Bakker HC, Wiedmann M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*, 2011; 301(2): 79-96.
- Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(1): 16-23.
- Rebagliati V, Philippi R, Rossi M, Troncoso A. Prevention of foodborne listeriosis. *Indian J Pathol Microbiol* 2009; 52(2): 145-9.
- Villegas M, Zavaleta A, Soto J. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from Hospital Materno Infantil San Bartolomé, Lima-Perú. *Ciencia e Investigación* 2012; 15(1): 20-24.
- Carpentier B, Cerf O. Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol* 2011; 145(1): 1-8.

12. Vera A, González G, Domínguez M, Bello H. Main virulence factors of *Listeria monocytogenes* and its regulation. *Rev Chil Infectol* 2013; 30(4): 407-16.
13. FDA-CFSAN, USDA-FSIS. Structure and initial data survey for the risk assessment of the public health impact of food borne *Listeria monocytogenes*. [En línea] último acceso 09 abril 2001. Disponible en: <http://webharvest.gov/petho4/2004110122429/http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/listrisk.html>
14. FDA-CFSAN. "*Listeria monocytogenes*". En: *Bacteriological Analytical Manual*. 9th ed. Capítulo 10. 2001.
15. Fernández-Garayzábal JF, Suarez G, Blanco MM, Gibello A, Domínguez L. Taxonomic note: a proposal for reviewing the interpretation of the CAMP reaction between *Listeria monocytogenes* and *Rhodococcus equi*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996; 46(3): 832-4.
16. Monteiro L, Mesquita A, Andre M, Cardoso J. Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from animal products in a city of Northern Brazil. *Cienc Rural* 2013; 43(8): 1443-8.
17. Pérez E, Chávez M. Frecuencia de *Listeria monocytogenes* en tomate, zanahoria, espinaca, lechuga y rabanito, expendidos en Mercados de Trujillo, Perú. *Ciencia y Tecnología*, 2012;8(22): 11-21.

Correspondencia

Nombre: María E. Pérez
 Dirección: Dirección de Salud (DISA) Lima Sur
 E-mail: alarcop104@hotmail.com