

Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. INHA

## **DETERMINACIÓN DE LISTERIA SPP. EN QUESOS Y EMBUTIDOS COMERCIALIZADOS EN CUBA**

*Tamara Kely Martino Zagovalov,<sup>1</sup> Virginia Leyva Castillo,<sup>2</sup> Anay Pérez Chang,<sup>3</sup> Maritza de los Reyes,<sup>4</sup> Francisco Suárez Herrera<sup>5</sup> y César Lara Ortiz<sup>6</sup>*

**RESUMEN:** La *Listeria monocytogenes* es un patógeno emergente causante de una enfermedad transmitida a través de los alimentos conocida como listeriosis, que cursa de forma grave y generalmente deja secuelas en las personas que la sobreviven. La detección de la *L. monocytogenes* en los alimentos de mayor riesgo, como son los listos para el consumo reviste gran importancia. En el presente trabajo se determinó la incidencia de la *Listeria* en 54 muestras de quesos y 98 de embutidos y ahumados, comercializados en Cuba. Se aplicó un método tradicional para la detección cualitativa y cuantitativa de la *L. monocytogenes* según la Norma UNE-EN ISO 11290-1 (1997) y el Draft International Standard ISO/DIS 11290-2 (1995), además se realizaron pruebas bioquímicas adicionales para la identificación de otras especies de *Listeria*. Para la detección cualitativa de la *Listeria* también se aplicó una prueba de diagnóstico rápido. La *L. monocytogenes* se aisló en queso azul, en salchichón y mortadela; la *L. innocua*: en queso fresco y queso cubanita, en chorizo, longaniza magro y morcilla y la *L. welshimeri*: en salchichas. Las dos especies halladas en salchichón se encontraron asociadas a una misma muestra. En otras tres muestras (pollo ahumado, chorizo, mortadela) se detectó la *Listeria* por la prueba rápida, sin lograr el aislamiento por el método tradicional, lo cual se debe a la mayor sensibilidad del primer método. La enumeración resultó  $< 10^2$  UFC/g de alimento en todos los casos. La utilización de la técnica cualitativa permitió demostrar la presencia de la *L. monocytogenes* en tres de las muestras analizadas lo cual limita estos productos para su comercialización y consumo.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, *Listeria*, quesos, embutidos, ahumados, determinación microbiológica, infección alimentaria.

### **INTRODUCCIÓN**

La *Listeria monocytogenes*, patógeno emergente o nuevo desconocido hasta hace algún tiempo, es el agente causal de una enfermedad transmitida por alimentos conocida como listeriosis.<sup>1</sup>

La listeriosis es 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

del siglo xx, donde se comenzaron a apreciar diversos episodios asociados a la alimentación.<sup>2</sup> Su incidencia es diferente de un país a otro y se presenta tanto en forma epidémica como esporádica.<sup>3</sup> Afecta a niños (incluyendo recién nacidos y lactantes), embarazadas y sus fetos, ancianos y personas inmunocomprometidas;<sup>4</sup> 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. Las principales formas clinicopatológicas

<sup>1</sup> Investigadora Agregada. Jefa del Laboratorio Principal de Bacteriología.

<sup>2</sup> Investigadora Auxiliar. Jefa del Dpto. de Microbiología de Alimentos.

<sup>3</sup> Aspirante a Investigadora. Laboratorio Principal de Bacteriología.

<sup>4</sup> Técnico A. Laboratorio Principal de Bacteriología.

<sup>5</sup> Técnico en adiestramiento. Laboratorio Principal de Bacteriología.

<sup>6</sup> Técnico A. Jefe del Laboratorio de Medios de Cultivo.

de la listeriosis son: encefalitis, septicemia, meningitis (fundamentalmente del feto o del recién nacido), aborto y muerte neonatal;<sup>4</sup> existen formas de listeriosis, menos frecuentes: queratoconjuntivitis, mamitis, dermatitis, endocarditis,<sup>1</sup> y recientemente se han documentado casos de enfermedad gastrointestinal leve tras la ingestión de alimentos.<sup>5</sup>

La *L. monocytogenes*, es un microorganismo ubicuo por lo que se encuentra en los ambientes más diversos, posee una sorprendente resistencia al medio, siendo capaz de sobrevivir y multiplicarse en los alimentos en condiciones de temperatura y pH que no resultan de ordinario habituales en otros organismos patógenos.<sup>3,5</sup> Por todo lo antes expuesto se hace necesario mantener un sistema de vigilancia sobre los alimentos de mayor riesgo.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de *Listeria* con el empleo de un método microbiológico tradicional y un método rápido de detección, en quesos y en productos cárnicos listos para el consumo: embutidos y ahumados, comercializados en nuestro país.

## MÉTODOS

Se analizaron 54 muestras pertenecientes a 24 tipos de queso (tabla 1) y 98 muestras de embutidos y ahumados (tabla 2).

Para la detección cualitativa y cuantitativa de la *Listeria spp.* se procedió según lo descrito en la Norma UNE-EN ISO 11290-16 y en el Draft International Standard ISO/DIS 11290-27 (fig. 1):

a) Detección cuantitativa: Se tomaron aseptícamente 25 o 50 g de la muestra y se adicionaron en un erlenmeyer que contenía 225 o 450 mL respectivamente de caldo fraser a media concentración (sin adición del suplemento del

medio). La muestra se homogenizó en el caldo con el empleo de una bolsa de stomacher y homogenizador peristáltico. A continuación se inocularon, por siembra en superficie, dos placas con Agar Oxford y Agar Palcam, medios selectivo-diferenciales, estas se incubaron de 35-37 °C hasta 48 horas. Posteriormente se determinó la concentración expresándola en UFC/g de alimento.

b) Detección cualitativa: Al caldo fraser a media concentración inoculado con la muestra de alimento se le añadió el suplemento requerido y se incubó a 30 °C por 24 horas. Se tomó una alícuota de 0,1 mL y se añadió a un tubo conteniendo 10 mL caldo fraser completo, este último se incubó a 37 °C durante 48 horas. De ambos caldos se realizó aislamiento en placas con Agar Palcam y Agar Oxford, se seleccionaron colonias típicas y se realizó la confirmación mediante pruebas bioquímicas y fisiológicas.

Para la detección cualitativa se aplicó, además, la prueba: *Listeria* Rapid Test de Oxoid<sup>8</sup> (fig. 1).

Del caldo fraser a media concentración se tomó otra alícuota de 0,1 mL (de forma paralela a la inoculación del caldo fraser completo) y se añadió a un tubo conteniendo 10 mL de caldo de enriquecimiento de *Listeria* Buforado (BLEEB) y se incubó a 30 °C durante 24 horas. A continuación se tomaron 2 mL de BLEEB y se pasaron a un tubo de ensayo que se calentó durante 20 minutos a 80 °C en baño de agua; después que se enfrió el extracto a temperatura ambiente, se tomaron 135 µL de este y se aplicó sobre la ventana de muestra que posee el dispositivo de la prueba; pasados 20 minutos se examinó la aparición de una línea azul de cualquier intensidad en la ventana de resultados, la cual indica un resultado positivo y la aparición de una línea azul en la ventana de control del dispositivo.

**TABLA 1. Relación de las muestras analizadas de queso**

Muestra (cantidad)	Muestra (cantidad)	Muestra (cantidad)
Queso (1)	Queso cubanito (3)	Queso Patagras (2)
Queso azul (4)	Queso fresco probiótico (1)	Queso Tierno (1)
Queso fundido (2)	Queso fresco de Búfala (5)	Queso Gratina (1)
Queso Lunch (2)	Queso Chibiales (1)	Queso Duro (1)
Queso blanco (3)	Queso Cumanayagua (3)	Queso blanco fresco de leche de vaca (1)
Queso Masdaam (3)	Queso Rebanado (1)	Queso fresco de cabra (1)
Queso mediodurado (3)	Queso Caluna (3)	Queso curado (3)
Queso Mozzarella (2)	Queso Galaxia (1)	Queso Gouda (6)

**TABLA 2. Relación de las muestras analizadas de embutidos y ahumados**

Muestra (cantidad)	Muestra (cantidad)	Muestra (cantidad)
Bocata (8)	Longaniza magro (1)	Mortadela (18)
Chorizo (18)	Lomo (3)	Tocineta (1)
Jamón (17)	Morcilla (4)	Salchichón (4)
Jamonada (10)	Perros calientes (1)	Salami (4)
Lacón (2)	Pollo ahumado (1)	Salchichas (6)

Cuando la prueba rápida ofreció resultados positivos se realizó el aislamiento, a partir de BLEEB, en Agar Oxford y Agar Palcam y se procedió igual que en el método tradicional.

A las colonias seleccionadas se le realizaron las siguientes pruebas para la confirmación (bioquímica y fisiológica) de *L. monocytogenes*:<sup>6</sup> tinción de Gram, movilidad

a 25 0C, catalasa, hemólisis, producción de ácido de ramnosa y xilosa, reducción de nitrato y prueba de CAMP con *Staphylococcus aureus*.

Para la diferenciación de otras especies de *Listeria* se realizaron como pruebas complementarias: producción de ácido de manitol y reducción de nitrato.<sup>2</sup>

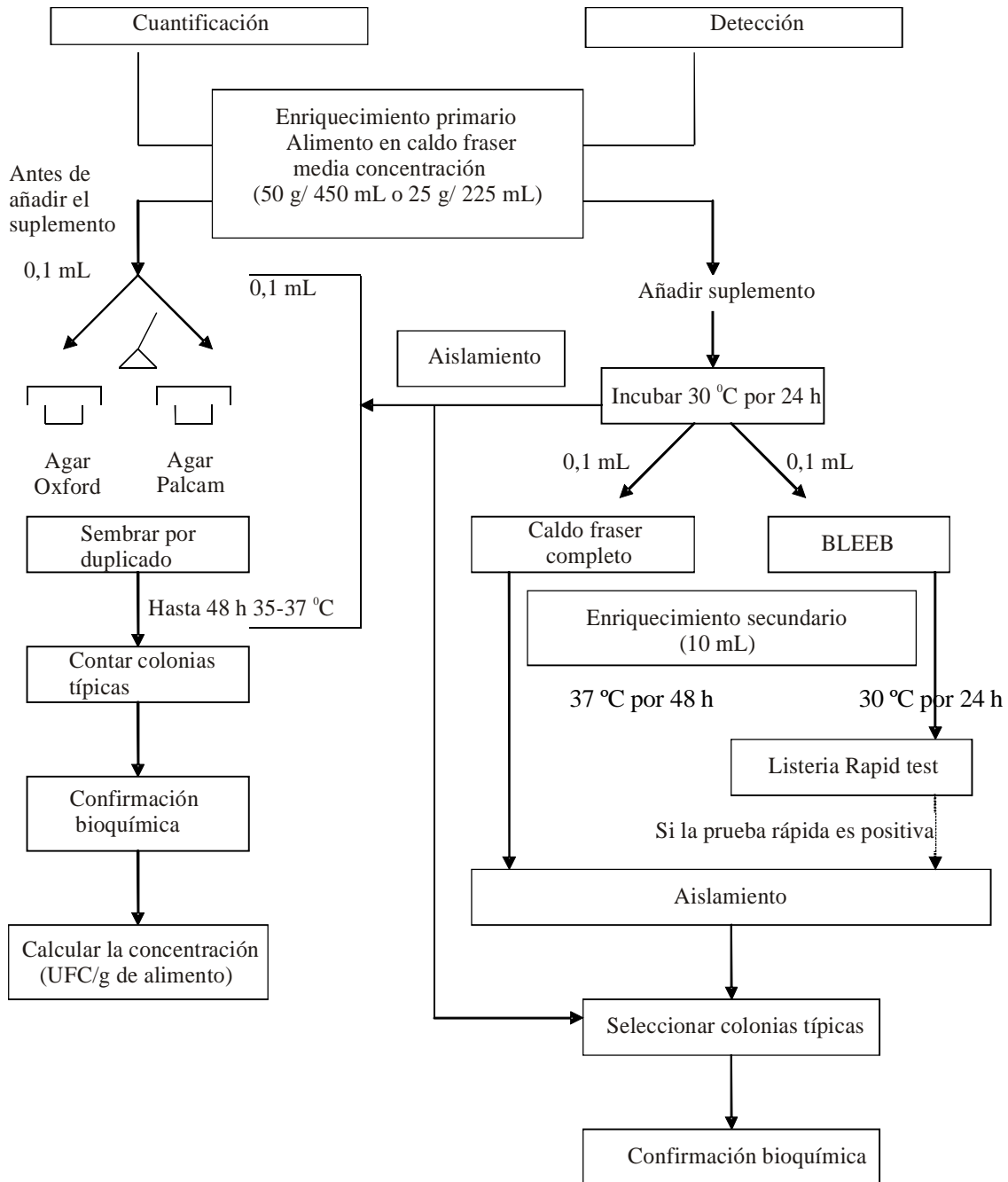


FIG. 1. Diagrama del procedimiento para la detección cuantitativa y cualitativa de la *Listeria spp.*

## RESULTADOS

La *Listeria* se detectó sólo en tres de las muestras de queso analizadas, tanto por el método rápido como por el método tradicional (tabla 3). Las muestras implicadas fueron: queso azul, queso cubanita y queso frescal. En el queso azul se demostró la presencia de la *L. monocytogenes* y en los otros tipos de queso, la *L. innocua*.

En los embutidos y ahumados se encontró la *Listeria*, en 9 muestras (tabla 3). En el salchichón y la mortadela se aisló la *L. monocytogenes*; en el chorizo, la longaniza magro, la morcilla y el salchichón: *L. innocua* y en salchichas: *L. welshimeri*. Es de señalar que las dos especies encontradas en el salchichón estaban asociadas a una misma muestra.

En tres muestras, correspondientes a chorizo, pollo ahumado y mortadela, se detectó la *Listeria* al aplicar la prueba rápida, sin que fuera posible realizar la detección por el método tradicional.

En la figura 2 se pueden apreciar algunos resultados obtenidos en las pruebas rápidas realizadas.

La enumeración ofreció valores de concentración inferiores a  $10^2$  UFC/g de alimento en todos los casos.

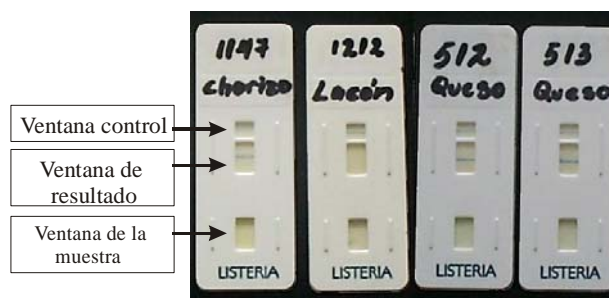


FIG. 2. Algunos resultados obtenidos al aplicar la prueba rápida. La línea en la ventana de resultado indica que la prueba es positiva.

## DISCUSIÓN

En los quesos los aislamientos de *Listeria* obtenidos representan un 5,6 % de incidencia, de ellos a la *L. monocytogenes* corresponde el 1,9 % de positividad y a la *L. innocua* el 3,7 % (fig. 3). Al analizar los resultados obtenidos en diferentes trabajos se aprecia que el porcentaje de

TABLA 3. Resultados obtenidos en la identificación de las especies de *Listeria*

Muestra	Tinción de Gram	Catalasa	Movilidad a 25 °C	Prueba rápida	Hemólisis	Producción de ácido			Nitrito	CAMP ( <i>St. aureus</i> )	Resultado		
						Ramnosa	Xilosa	Manitol					
Queso azul	Bacilos cortos grampositivos en cadena	+	+/- forma de sombrilla	+	β	+	-	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>		
Queso frescal				+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
Queso cubanita				+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
Chorizo				+	-	+	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
Longaniza magro				+	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
Morcilla				+	-	+	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>
Salchichas				+	-	+	-	-	+	+	-	-	<i>L. welshimeri</i>
Mortadela				+	-	+	β	+	-	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>
Salchichón				+	β	+	-	-	-	+	<i>L. monocytogenes</i>		
				-	+	-	-	-	-	-	-	<i>L. innocua</i>	
Pollo ahumado	NR	NR	NR	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Listeria spp.</i>		
Chorizo				+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Listeria spp.</i>	
Mortadela				+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	<i>Listeria spp.</i>	

Legenda: +: positivo, -: negativo, NR: No realizado, β: hemólisis total

aislamiento de la *L. monocytogenes* en estos alimentos, oscila entre un 0,5 % y un 26,7 %.<sup>1</sup> Los quesos analizados fueron elaborados a partir de leche pasteurizada y por su contenido acuoso se clasifican como semiduros. Según se aprecia en la literatura, usualmente los quesos de pasta blanda, son los que presentan mayor porcentaje de aislamiento,<sup>2</sup> no así los quesos semiduros. Por otra parte, se ha encontrado la *L. monocytogenes* en los quesos elaborados tanto con leche pasteurizada como con leche cruda;<sup>9-11</sup> es de señalar, que en los quesos elaborados a partir de la leche pasteurizada, la contaminación del alimento puede ocurrir en los lugares donde se elaboran, se transportan o se almacenan estos, dada la factibilidad que existe de la presencia de la *Listeria* en dichos lugares.<sup>1,12</sup>

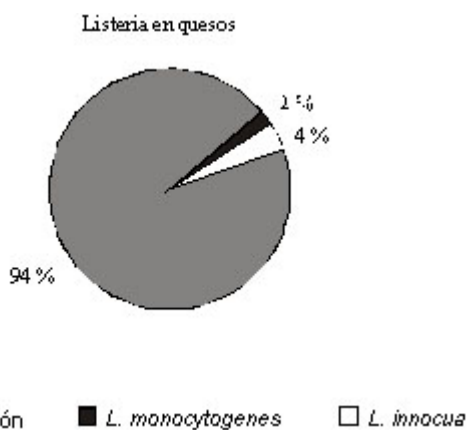


FIG. 3. Comportamiento de la detección de *Listeria spp.* en las muestras de queso analizadas. Los resultados se muestran en porcentaje.

En la detección cuantitativa los valores de concentración obtenidos fueron bajos, lo cual se debe a que la totalidad de los quesos trabajados son semiduros y es en los de pasta blanda, donde se aprecia recuentos más elevados de la bacteria.<sup>13,14</sup>

En las muestras de embutidos y ahumados, en tres ocasiones se detectó la *Listeria* en la prueba rápida sin que fuera posible aislar la bacteria en los medios selectivo-diferenciales y por tanto no se determinó, en estos casos la especie en cuestión. Estos resultados se deben a la mayor sensibilidad que posee el método rápido con respecto al tradicional, este se basa en la detección de antígenos flagelares comunes a las especies que conforman el género *Listeria* y permite su detección en niveles inferiores de entre 3 y 10 células/g de alimento según la especie en particular.<sup>8</sup> Este método a pesar de que no permite conocer la especie de la *Listeria* en cuestión, resulta útil cuando se necesitan obtener resultados en un plazo de tiempo corto, como ocurre al trabajar alimentos relacionados con brotes donde se sospecha de la presencia de la *L. monocytogenes* o cuando el análisis se realice a nivel de industria.

En los productos cárnicos analizados la *Listeria* tuvo una incidencia del 9,2 % por alimento; la *L. monocytogenes* se encontró en dos muestras lo cual representa una positividad del 2,0 %; la *L. innocua* y la *L. welshimeri* se aislaron en el 4,1 % y en el 1,0 % de las muestras, respectivamente y la *Listeria spp.*, en el 3,1 % (fig. 4).

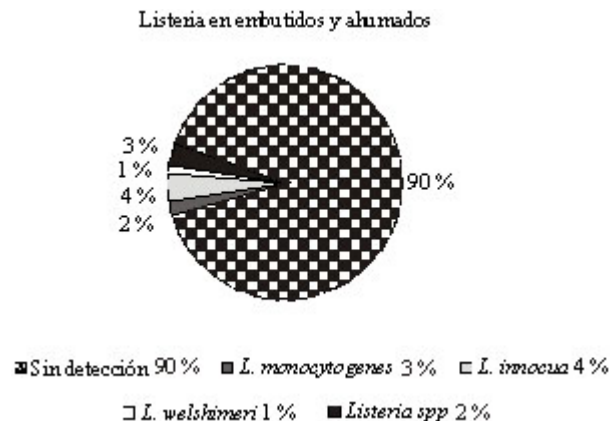


FIG. 4. Comportamiento de la detección de *Listeria spp.* en las muestras de embutidos y ahumados analizadas. Los resultados se muestran en porcentaje.

Para carnes y productos cárnicos que sufren procedimientos de conservación, basados en la maduración o el calentamiento y para los cocidos, los resultados son diversos; para aquellos curados mediante salazón, desecación y/o adición de sales nitrificantes, la *L. monocytogenes*, en su mayoría, se detecta en porcentajes que oscilan entre 2,7 y 72,2 %.<sup>1,13,15</sup>

Además se conoce que la *L. monocytogenes* es capaz de sobrevivir al proceso de fermentación de diferentes productos lácteos<sup>1</sup> y cárnicos,<sup>16</sup> permaneciendo viable en estos durante su almacenamiento a temperatura de refrigeración.

La *L. monocytogenes* es la única especie del género considerada patógena para el hombre,<sup>4</sup> los aislamientos de este microorganismo fueron obtenidos en la técnica cualitativa y no en la cuantitativa. En la actualidad existen propuestas de límites internacionales para este patógeno en las que se plantea, para los alimentos de alto riesgo: ausencia de la *L. monocytogenes*<sup>17</sup> y para otros alimentos: <10<sup>2</sup> UFC/g<sup>5</sup>.

Teniendo en cuenta que el queso es considerado un alimento de alto riesgo por el número de brotes en que ha estado implicado<sup>1,4</sup> y al igual que los embutidos y ahumados son alimentos listos para el consumo, se demostró la importancia del estudio de la *L. monocytogenes*, ya que su aislamiento en estos limita su comercialización y consumo.

**SUMMARY:** *Listeria monocytogenes* is an emerging pathogen causing a food-borne disease called listeriosis that seriously affects people and generally leaves sequelae in survivors. Detection of *L. monocytogenes* in high-risk foodstuffs such as ready-to-eat food is overly important. The present paper determined the incidence of *Listeria* in 54 cheese samples and 98 samples of sausage and smoked products that are sold in Cuba by using a traditional method for qualitative and quantitative detection of *L. monocytogenes* according to Standard UNE-EN ISO 11290-2 (1997) and Draft International Standard ISO/DIS 11290-2 (1995). Additional biochemical tests for detection of other *Listeria* species. A rapid diagnostic test was used for qualitative detection. *L. monocytogenes* was isolated from blue cheese, salami and mortadella samples. *L. innocua* was detected in Frescal and Cubanito types of cheese, chorizo (highly seasoned pork sausage), longaniza magro (spiced pork sausage) and blood sausage whereas *L. weishimeri* was found in sausages. Two *L. Species* were present in the same salami sample. In other three samples (smoked chicken, chorizo and mortadella) the rapid test could detect *Listeria* although it was not possible to isolate it by the traditional method, which is due to the higher sensitivity of the former method. Enumeration was 10<sup>2</sup> UFC/g of food in all cases. The qualitative technique allowed demonstrating the presence of *L. monocytogenes* in three of the analyzed samples, which restricts the sale and consumption of the above-mentioned products.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, *Listeria*, cheese, pork sausages, smoked products, microbiological determination, food poisoning.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. España. Ministerio de Sanidad y Consumo. Secretaría General Técnica. *Listeria* en alimentos. Conferencia consenso. León: Universidad; 1993.
2. Martínez N. *Listeria monocytogenes*. En: Refugio Torres MA, ed. Agentes patógenos transmitidos por alimentos. Vol. I. Jalisco: Universidad de Guadalajara; 2002. p. 263-309.
3. ICMSF. Blackie Academic & professional. Micro-organisms in foods 5. Characteristic of microbial pathogens. 1ra. Edición. 1996.
4. Jay J. Microbiología moderna de los alimentos. 3ra. ed. Madrid: Acribia; 1994.
5. Codex Alimentarius Comision. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. Comité del CODEX sobre la Higiene de los Alimentos. Trigésimo tercera reunión. Washington D.C. E.U.A. Anteproyecto de directrices para el control de *Listeria monocytogenes* en alimentos, Washington, DC. CX/FH 00/9. 2000.
6. UNE-EN ISO 11290-1. Microbiología de los alimentos para consumo humano y para animales. Método horizontal para la detección y el recuento de *Listeria monocytogenes*. Parte 1: Método de detección. 1997.
7. Draft International Standard. ISO/DIS 11290-2: Microbiology of food and animal feeding stuffs-horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method. 1995.
8. Oxoid. *Listeria* rapid test. Performance tested AOAC, Research Institute, license number 960701, England.1999.
9. Beckers HJ, Soentero P, Delfgou-Van Asch E. The occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft cheeses and raw milk and its resistance to heat. Int J Food Microbiol. 1987; 8: 249-56.
10. Pini P, Gilbert RA. Comparison of two procedures for the isolation of *Listeria monocytogenes* from raw chickens and soft cheeses. Int J Food Microbiol. 1988; 7: 331-7.
11. Van Netten P, Perales I, Van de Mosdijk A, Curtis G, Mossel D. Liquid and solid selective differential media for the detection and enumeration of *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp. Int. J. Food Microbiol. 1989;8:299-316.
12. Fleming D, Cochi S, MacDonald K, Brondum J, Playkatis B, Colmes M. et al. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. N Engl J Med 1985;312:404-7.
13. Breer C, Schopfer K. *Listeria* and food. Lancet 1988;2:1022.
14. Rodler M, Körbler W. Examination of *Listeria monocytogenes* in milk products. Acta Microbiol. Hung. 1989;36(3):259-61.
15. Grau F, Vnadelinden P. Occurrence, number and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats. J Food Prot. 1992;55:4-7.
16. Glass K, Doile M. Fate of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged beef J. Food Prot. 1990;53:739-41.
17. Codex Alimentarius Comision. Food and Agriculture Organization on the United Nations. World Health Organization. Second session working paper on elaboration of regional standard for microbiological levels in food (prepared by Egip), Cairo, Egypt. CX/NEA 03/16. 2002.

Recibido: 21 de diciembre de 2004. Aprobado: 15 de febrero de 2005.  
 Tamara Kely Martino Zagovalov. Instituto de Nutrición e Higiene de los Alimentos. Infanta No. 1158 e/ Llinás y Clavel. Centro Habana. Ciudad de La Habana. Cuba. E-mail: tamara.martino@infomed.sld.cu