

AISLAMIENTO DE *LISTERIA* SP. DE DIVERSOS ALIMENTOS EN COSTA RICA

Ricardo Ellner*, Dagmar Utzinger*, Vera García*

Key Words: *Listeria monocytogenes*, various food products.

RESUMEN

Se realizó análisis por *Listeria monocytogenes* a 112 muestras de diversos alimentos, 92 recolectadas en el Mercado Central de San José y 20 de leche cruda obtenidas en lecherías de Guápiles, Limón y de Moravia, San José, Costa Rica. Para el aislamiento se procedió a realizar un enriquecimiento en caldo Lovett, rayando posteriormente en Agar Oxford. La identificación se basó principalmente en pruebas bioquímicas. Se aisló *L. monocytogenes* de 16 (14%) muestras, distribuidas de la siguiente manera: 1 de 10 (10%) de queso blanco, 6 de 15 (40%) de helado, 5 de 10 (50%) de pescado fresco y 4 de 12 (33%) de camarón fresco. Además se aisló *L. innocua* de 13 (12%) y *Listeria spp.* de 4 (3.5%) de las muestras analizadas. Estos resultados justifican realizar estudios más detallados que establezcan el riesgo a la salud pública, por el consumo de alimentos contaminados con *L. monocytogenes*, en este país (Rev. Cost. Cienc. Méd. 1991; 12(3-4); 33-39).

INTRODUCCION

La listeriosis es una enfermedad que tiene varias manifestaciones, y que

* Departamento de Microbiología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

puede producir una diversidad de síntomas en el ser humano. Las formas más importantes son la listeriosis de la mujer durante el embarazo, la listeriosis del feto con daño a éste, aborto o muerte al nacer, la meningitis y la septicemia.

Listeria monocytogenes se encuentra ampliamente distribuida en el ambiente por lo que el hombre se encuentra expuesto a la bacteria de diversas formas. Una de estas es a través de los alimentos contaminados, lo que ha sido demostrado por los brotes producidos por ingestión de repollo (26), leche pasteurizada (13), queso tipo mexicano (4) y vegetales crudos (17), entre otros. Actualmente, se llevan a cabo estudios en diversas partes del mundo para determinar la presencia de este microorganismo en los alimentos. Estos resultados darán un cuadro más claro del problema, y confirmarán su amenaza como patógeno transmitido por alimentos.

Por otro lado, en Costa Rica han ocurrido varios casos de listeriosis, por lo que consideramos importante realizar un estudio preliminar que contribuya a establecer el papel que puedan jugar los alimentos, en este país, como posible fuente de contaminación.

MATERIAL Y METODOS

Se recolectaron 92 muestras de diversos alimentos distribuidos de la siguiente manera:

queso blanco	10
helados	15
natilla casera	8
yogurt líquido	6
carne molida	10
chorizo	6
pollo fresco	10
pescado fresco	10
camarones frescos	12
repollo	5

Las muestras se adquirieron tal como se expenden en el Mercado Central de San José, y en su mismo empaque se trasladaron al laboratorio. Fueron procesadas el mismo día de compra, o empacadas en doble bolsa plástica y almacenados a 4°C por no más de 48 horas.

Las muestras de leche se adquirieron de dos productores, 10 muestras provenientes de una finca de Moravia, provincia de San José, y 10 de una finca en Guápiles, provincia de Limón.

Se tomaron muestras de aproximadamente 100 ml en botellas estériles las cuales fueron colocadas en una hielera para su traslado al laboratorio. Se procesaron el mismo día que se recolectaron.

Se pesó asepticamente una porción de 25 g, representativa de la muestra, o, en el caso de la leche, se tomó 25 ml de la muestra bien homogenizada. Las muestras sólidas se colocaron en un frasco estéril de licuadora, se agregó 225 ml de caldo Lovett (23), y se licuó por 1 a 2 minutos a velocidad media, posteriormente se pasó el licuado a un erlenmeyer estéril de 500 ml. La leche se colocó directamente en un erlenmeyer estéril, se le agregó 225 ml del caldo Lovett y se mezcló por agitación. En todos los casos se incubó a 30°C por 3 y 7 días. Al cabo de la incubación, se tomó una asada de la superficie y se

rayó sobre Agar Oxford (6). Las placas se incubaron a 37°C por 48 horas.

Las colonias sospechosas de ser *Listeria* se rayaron en Agar Tripticasa Soya (BBL). Posteriormente se realizaron las siguientes pruebas de acuerdo al esquema propuesto por Seeliger y Jones (25): tinción de Gram, catalasa, movilidad, Voges Proskauer, producción de urea, producción de H₂S (TSI), reducción de nitrato, hidrólisis del almidón, hidrólisis del hipurato, B-hemólisis, prueba de CAMP con *Staphylococcus aureus* (CIP 57.10) y la fermentación de: glucosa, D-xilosa, ramnosa, salicina y manitol. Se usó como control en las diferentes pruebas los siguientes microorganismos: *Listeria monocytogenes* (DSM-20-600), *Listeria innocua* (ATCC 3-3091) y *Enterococcus faecalis* (ATCC 19-433).

RESULTADOS Y DISCUSION

En ninguna de las 20 muestras de leche cruda, se logró aislar la bacteria (Cuadro 1). En estudios realizados por Liewen & Plautz (22), encontraron 4% de 200 muestras positivas en Nebraska, EUA. Datos similares han obtenido Lovett *et al.* (23) en EUA, Farber *et al.* (10) en Canadá y Davidson *et al.* (8) en Manitoba. Hayes *et al.* (14) en EUA reportan 12% en el estado de Georgia y Domínguez Rodríguez *et al.* (9), en el centro y oeste de España, encontraron un 45,3% en 95 muestras. Los resultados de estos autores indican que la *Listeria monocytogenes* se encuentra presente con frecuencia en la leche cruda, por lo que debe ser manejada tomando en cuenta este hecho.

Como se puede observar en el Cuadro 1, se logró aislar *L. monocytogenes* en 6 muestras de 15 de helado, lo cual

CUADRO 1
 AISLAMIENTO DE *LISTERIA* SPP. DE DIVERSOS
 ALIMENTOS EN COSTA RICA

Alimento	Aislamiento de:			
	Número de muestras	<i>L. monocytogenes</i> Nº (%)	<i>L. innocua</i> Nº (%)	<i>Listeria</i> spp. Nº (%)
Leche cruda	20	0	0	0
Queso blanco	10	1 (10)	0	0
Natilla casera	8	0	0	0
Yogurt líquido	6	0	0	0
Helado	15	6 (40)	0	0
Carne molida	10	0	0	0
Chorizo	6	0	0	0
Pollo	10	0	3 (30)	3 (30)
Pescado fresco	10	5 (50)	2 (20)	1 (10)
Camarones frescos	12	4 (33)	8 (67)	0
Repollo	5	0	0	0
TOTAL	112	16 (14)	13 (11,6)	4 (3,5)

representa un porcentaje demasiado alto (40%) en relación con lo informado en la literatura en donde se menciona incidencias de contaminación que varían de 0 a 5,5% (2, 11, 18, 30). Cabe señalar que en este estudio se obtuvo muestras de 3 marcas diferentes (5 unidades de cada una). De dos de ellas, se obtuvo cajitas de 125 ml resultando

sólo una positiva. Las otras 5 muestras fueron obtenidas en forma de conos, de 5 sabores diferentes, en una sola oportunidad. Lo anterior parece indicar que la *L. monocytogenes* se encontraba en el dispensador, posiblemente proveniente del agua donde éste se introduce. Aunque nuestro muestreo es limitado, el hallazgo llama la atención y

sugiere realizar un estudio más amplio, sobre todo si se considera que se ha encontrado que cepas de *L. monocytogenes* aisladas de helado han confirmado ser patogénicas (5), y que Hitchins (16) señala que la presencia de este organismo en helados ha producido grandes pérdidas económicas para esta industria en los últimos años al ser decomisados varios lotes por la Administración de Alimentos y Drogas de los EUA (FDA).

De las 10 muestras de queso blanco analizadas (Cuadro 1), una reveló la presencia de *Listeria monocytogenes*, lo que resulta importante si se toma en cuenta lo limitado del muestreo. Este dato concuerda con el mencionado por Kvenberg (20) quien señala que en el Reino Unido en un estudio de 222 quesos la bacteria se encontró en un 10% de las muestras. En Costa Rica, este tipo de queso frecuentemente se elabora de leche sin pasteurizar y en forma artesanal, por lo que puede representar un riesgo potencial de transmisión. Uno de los primeros brotes de listeriosis vía alimentos se presentó en California, debido a un queso tipo "mexicano" contaminado con *L. monocytogenes* (4). Posteriormente, en 1986, se detectó el organismo en queso tipo "Brie", importado a los EUA de Francia (1).

Nuestro estudio no reveló la presencia de *L. monocytogenes* en yogurt ni en natilla (Cuadro 1), lo que podría asociarse a su bajo pH y a la competencia de los cultivos utilizados para su preparación. No obstante, los estudios de Schaack y Marth (27) indican que si la contaminación proviene de la leche, la supervivencia de la bacteria depende del tipo de inóculo utilizado, y varía desde 1 a 12 días. Por otro lado, Choi *et al.* (7) revelan que si la contaminación

es posterior al proceso, el patógeno puede sobrevivir entre 18 y 26 días.

Las muestras de pescado analizadas, así como las de camarón, resultaron ser las que con mayor frecuencia revelaron la presencia de *L. monocytogenes*, pues se encontró en 5 de 10 de pescado y en 4 de 12 de camarón (Cuadro 1). Aunque en Nueva Zelanda se implicó a bivalvos y pescado en un brote de listeriosis (21), es relativamente poco lo que se conoce sobre la incidencia de este organismo en productos del mar. Weagant *et al.* (29), realizaron un estudio analizando muestras de 9 países alrededor del mundo, y encontraron 15/57 muestras positivas. Las muestras incluían camarón fresco y cocido, langosta, langostinos y cangrejos entre otros. Asimismo, un estudio realizado en Italia por Caserio *et al.* (3) revela la presencia de *L. monocytogenes* en 24,7% de 85 muestras de pescado y mariscos.

No se logró aislar el microorganismo en estudio de 5 muestras de repollo analizadas (Cuadro 1); sin embargo debe recordarse que *L. monocytogenes* prevalece en la naturaleza y se ha aislado del suelo, de aguas negras, y de heces de animales, lo cual puede ser fuente de contaminación para las hortalizas. En 1986, Ho *et al.* (17) relacionaron el consumo de vegetales crudos con un brote de listeriosis en Boston y en 1983, Schlech *et al.* (26) informaron de otro brote en Canadá atribuido a repollo contaminado en una finca donde había ovejas con listeriosis. Petran *et al.* (24) realizaron un estudio en diversos vegetales frescos en EUA y no encontraron la bacteria y Heisick *et al.* (15) en un estudio de 1000 muestras de vegetales frescos en Minneapolis, EUA, encontraron sólo 1 de 92 muestras de repollo contaminada con *L. monocytogenes*.

Se encuentran datos de la presencia de *L. monocytogenes* en carne de pollo, que oscilan entre 14,7% y 50% de las muestras investigadas (12). Sin embargo, en nuestro estudio ninguna de las 10 muestras puso en evidencia al microorganismo (Cuadro 1). El alto porcentaje de muestras positivas se ha asociado al frecuente aislamiento de este microorganismo de las heces de las aves (28).

Ninguna de las muestras de carne molida y chorizo, analizadas, presentó *L. monocytogenes* (Cuadro 1). Estos resultados no concuerdan con datos de la literatura, donde se reportan incidencias en carne molida que van desde el 30% al 77% (12). Se considera que la razón del alto porcentaje de muestras positivas se debe a las numerosas oportunidades de contaminación de la carne, incluyendo el alto grado de asociación de la *Listeria* con los animales (19). En nuestro caso, lo limitado del muestreo puede haber influido en el resultado.

Estos resultados revelan, por primera vez, la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos en Costa Rica y establecen la necesidad de llevar a cabo estudios más detallados con el fin de determinar: 1) cuáles alimentos constituyen el mayor riesgo potencial para la salud y 2) las pérdidas económicas, que pueden darse, al exportar alimentos a mercados que han establecido normas en relación con esta bacteria.

AGRADECIMIENTO

Los autores desean agradecer al Sr. Eduardo Zúñiga Delgado su valiosa ayuda en el trabajo y al Dr. Mario Vargas por la revisión del manuscrito. Así mismo a la Vicerrectoría de Investi-

gación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento del proyecto N° 430-90-418.

ABSTRACT

Ninety two samples of various foods obtained from the Central Market in San José, and 20 raw milk samples collected from dairy farms in Guápiles, Limón and Moravia, San José, were analyzed to determine the presence of *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* was isolated from 16 (15%) of the samples: 1/10 (10%) from "white" farmer's cheese, 6/15 (40%) from ice-cream, 5/10 (50%) from raw fish and 4/ 12 (33%) from raw shrimp.

L. innocua was isolated in 13(12%) of the samples and *Listeria* spp. from 4 (3.5%).

These results justify further studies to analyze the food groups in more detail, in order to establish the potential public health risk in this country.

BIBLIOGRAFIA

1. Anónimo. More cheeses, ice cream linked to possible *Listeria*. *Food Chem. News*. 1987; 29(11):37-38.
2. Archer, DL. Review of the latest FDA information on the presence of *Listeria* in foods. WHO Informal Working Group on Foodborne Listeriosis, Geneva, 15-19 February, 1988.
3. Caserio, G.; Gronchi, Villa C. *Listeria* in cami, pesce, pollame, paste farcite e vegetali. *Industria Alimentari*, 1989; 28: 250-253.
4. CDC. Listeriosis outbreak associated with Mexican style cheese-California. *Morbid. Mortal. Weekly Rep. Center for Disease Control, Atlanta, Ga.* 1985; 34: 357-359.
5. Conner, D.E. Pathogenicity of Foodborne, Environmental and Clinical Isolates of

- Listeria monocytogenes* in Mice. *J. Food. Sci.* 1989; 54:1553-1556.
6. Curtis, GDW; Mitchell, RG; King, AF; Griffin, EJ. A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 1989; 8: 95-98.
 7. Choi, HZ; Schaack, MM; Marth, EH. Survival of *Listeria monocytogenes* in cultured buttermilk and yogurt. *Milchwissenschaft.* 1988; 43: 790-792.
 8. Davidson RJ; Sprung, DW; Park, CE; Rayman, MK. Occurrence of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. and *Yersinia enterocolitica* in Manitoba raw milk. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 1989; 22: 70-74.
 9. Domínguez Rodríguez, LJ; Fernández Garayzabal, F; Vázquez Boland, JAE; Rodríguez Ferri; Suárez Fernández, G. Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* a partir de lait cru destiné a la consommation humaine. *Can J. Microbiol.* 1985; 31: 938-941.
 10. Farber, JM; Johnston, MA; Purvis, O; Loit, A. Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 1987; 5:157-163.
 11. Farber, JM; Sanders, GW; Malcolm, SA. The presence of *Listeria* spp. in raw milk in Ontario. *Can. J. Microbiol.* 1988; 34: 95-100.
 12. Farber, JM; Sanders, GW; Johnston, MA. A survey of various foods for the presence of *Listeria* species. *J. Food Protect.* 1989; 52: 456-458.
 13. Fleming, DW; Cochi, SL; MacDonald, KL; Brondum, J; Hayes, PS; Plikaytis, BD; Holmes, MB; Audurics, A; Broome, CV; Reingold, AL. Pasteurized milk as a vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. *N.Eng. J. Med.* 1985; 312: 404-407.
 14. Hayes, PS; Feeley, JC; Graves, LM; Ajello, GW; Fleming, DW. Isolation of *Listeria monocytogenes* from raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 1986; 51:438-440.
 15. Heisick, JE; Wagner, DE; Nierman, ML. JT. Peeler. *Listeria* sp. found on fresh market produce. *Appl. Environ. Microbiol.* 1989; 55: 1925-1927.
 16. Hitchins, A.D. Quantitative comparison of two enrichment methods for isolating *Listeria monocytogenes* from inoculated ice cream. *J. Food Protect* 1989; 52: 898-900.
 17. Ho, JL; Shands, KN; Friedland, G; Eckind, P; Fraser, DW. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* 1986; 146: 520-524.
 18. Jackson, GJ. Update on microbial problems with dairy foods in the USA. Supplement to IDF Circular 87/3, *Listeria* and *Salmonella*, 1987; 12-13.
 19. Johnson JL; Doyle, MP; Cassens RG. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. *Int. J. Food Microbiol.* 1988; 6: 243-247.
 20. Kvenberg, J.E. Outbreak of listeriosis. *Listeria* contaminated foods. *Microbiol. Sci.* 1988; 5(12): 355-358.
 21. Lennon, D; Lewis, B; Mantell, C; Becroft D; Dove, B; Farmer, K; Tonkin, S; Yeates, N; Stamp, R; Mickleson, K. Epidemic perinatal listeriosis. *Pediat. Infect. Dis.* 1984; 3: 30-34.
 22. Liewen, MV; Plautz, MW. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Nebraska. *J. Food Protect.* 1988; 51: 840-841.
 23. Lovett, JD; Francis, DW; Hunt, JM. *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence and pathogenicity. *J. Food Protect.* 1987; 50: 188-192.
 24. Petran, RL; Zottola EA; Gravani, RB. Incidence of *Listeria monocytogenes* in market samples of fresh frozen vegetables. *J. Food. Sci.* 1988; 53:1238-1240.
 25. Seeliger, HPR; Jones, D. Genus *Listeria* Pirie 1940, 383^{AL}. *Bergey'S Manual of Systematic Bacteriology.* Williams and Wilkns Co., Baltimore, Maryland, 1986; 2: 1235-1245.
 26. Schlech, WF; Lavigne, PM; Bortolussi, RA; Allen, AC; Haldane, EV; Hightower, AW; Johnson, SE; King, SH; Nicholls, ES; and Broome, CV. Epidemic listeriosis evidence

- for transmission by food. *N. Eng. J. Med.* 1983. (308): 203-206.
27. Schaack, MM; Marth, EH. Survival of *Listeria monocytogenes* in refrigerated cultured milks and yogurt. *J. Food Protect.* 1988; 51:848-852.
 28. Skovgaard, N; Morgen, CA. Detection of *Listeria* spp. in feces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 1988; 6: 229-242.
 29. Weagant, SD; Sado, PN; Colburn, KG; Torkelson, JD; Stanley, FA; Krane, MH; Shields, SC; Thayer, CF. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Protect.* 1988; 51: 655-657.
 30. World Health Organization. Foodborne listeriosis. *Bull. WHO.* 1988; 66(4): 421-428.