



Incidencia de especies de *Listeria* en una planta productora de alimentos congelados

**FRANCISCO J. SÁNCHEZ V.*, VIVIANA MATA T.*, ARTURO ESPINOZA M.*,
LICET VILLARREAL T.***

Como consecuencia de la globalización, la industria alimentaria se ha desarrollado a pasos agigantados gracias a la adquisición de tecnología de punta y a la implementación de sistemas de calidad basados en buenas prácticas de manufactura y análisis de riesgos, con los que se ha incrementado la cantidad y calidad de productos dirigidos a una población más grande y exigente.¹

Los cambios demográficos, así como los estilos de vida del consumidor y las diversas preferencias alimenticias, han influido en la formulación, producción, preservación, empaque y distribución de los alimentos, originando la manufactura de alimentos prácticos o de conveniencia, frescos o mínimamente procesados que cumplan con las especificaciones de salud.² Sin embargo, las buenas prácticas de manufactura en la producción de alimentos no dan resultados satisfactorios cuando el hombre los contamina durante el proceso y manipulación del producto, representando esto una de las principales causas de enfermedades transmitidas por alimentos (ETAS),³ las cuales se consideran como la mayor causa de morbilidad y mortalidad en países industrializados y en vías de desarrollo.⁴

Los microorganismos no reconocidos como patógenos importantes en las últimas dos décadas recientemente han sido descritos y han adquirido un papel preponderante en la microbiología de alimentos, por lo que *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica*, son hoy en día motivo de preocupación para muchos productores de alimentos.^{2, 5}

Listeria monocytogenes ha sido reconocido como patógeno humano desde 1929; recientes estudios de casos epidémicos de listeriosis han incrementado la importancia de las fuentes de contaminación de este patógeno en enfermedades humanas, ya que diversas investigaciones epidemiológicas han demostrado que es una enfermedad transmitida por alimentos, que ocurre en grupos bien definidos de alto riesgo en los que se incluyen mujeres embarazadas, neonatos y adultos inmunocomprometidos. Varias condiciones clínicas como trasplante de órganos, terapia inmunosupresora, infección con virus de la inmunodeficiencia humana y edad avan-

* Laboratorio de Microbiología General y Laboratorio de Microbiología Médica y Sanitaria, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

zada se asocian con la listeriosis, cuya forma más común reportada es la bacteriemia, aunque también puede ocasionar sepsis, meningitis o meningoencefalitis. A diferencia de otras infecciones con patógenos como *Salmonella*, que raramente resulta en fatalidad, la listeriosis está asociada con una mortalidad del 20%.⁶

Objetivo

El objetivo de este estudio es determinar la incidencia de especies de *Listeria* en materia prima y producto terminado que se procesan en una planta de alimentos congelados, superficies vivas (manipuladores) e inertes (mesas de trabajo, utensilios, paredes etc.), agua y medio ambiente.

Metodología

1. Aislamiento de *Listeria spp.* en alimentos

A) Material biológico

Como cepa de referencia se utilizó *L. monocytogenes* Scott A, proporcionada por el Dr. James L. Smith del Departamento de Agricultura de Estados Unidos de Norteamérica, la cual se mantuvo en el medio agar soya tripticaseína (AST) (DIFCO) a 4°C.

B) Origen de la muestra

Las muestras fueron proporcionadas por una planta productora de alimentos congelados, y consistieron en: enchiladas, quesadillas, tacos de carne, hamburguesas de carne, hamburguesas de pollo, emparedados de jamón con queso y emparedados de ensalada de pollo, materia prima animal (queso, carne de res y carne de pollo) y vegetales (zanahorias, cebolla, chícharos, elote), que se transportaron y mantuvieron bajo refrigeración 18 h para su descongelación antes de proceder a su análisis.

C) Aislamiento de *Listeria spp.*

El aislamiento se llevó a cabo de acuerdo al método establecido para la determinación de *L. monocytogenes* en alimentos correspondiente a la

NOM-143-SSA1-1995,⁷ pero con la variante de llevar a cabo un segundo enriquecimiento selectivo como se menciona en los siguientes incisos.

a) Pre-enriquecimiento no selectivo

El empaque de los alimentos se desinfectó con alcohol al 70% en la zona de apertura del mismo. Bajo condiciones de asepsia se abrió el empaque con utensilios estériles, y se tomaron 25 g de muestra de diversas porciones de puntos distantes de cada producto. Esta cantidad de muestra se colocó en un frasco de licuadora y se le adicionaron 225 mL de caldo de soya tripticasa-extracto de levadura (CSTEL) (Difco), complementado con 1.4 mL de piruvato de sodio al 10%; la muestra y el caldo se homogeneizaron por espacio de 1-2 minutos resultando una mezcla, la cual se incubó a 35-37°C durante 24 h, se colocó nuevamente en el matraz erlenmeyer.

b) Enriquecimiento selectivo primario

A partir del CSTEL, se transfirió 1 mL a 10 mL de caldo de enriquecimiento *Listeria* (LEB) (Difco), éste se incubó a 35°C por 48 h.

c) Enriquecimiento selectivo secundario

Del LEB se tomó 1 mL para inocularlo en 10 mL de caldo Fraser (CF) (Difco) complementado con 0.1 mL de suplemento Fraser y se incubó a 35°C por 48 h.

d) Aislamiento selectivo

Los tubos de CF que no presentaron ennegrecimiento se consideraron negativos para *Listeria spp.* y presuntivos aquéllos que sí lo presentaron. Éstos se agitaron suavemente y se depositaron 2-3 asadas del mismo en placas con agar Oxford (OXA) (Difco) y agar moxalactam feniletanol cloruro de litio (LPM) (Difco), previamente preparados con complemento Oxford (Difco) y Moxalactam (Difco), respectivamente; el inóculo se sembró por estría en cuatro cuadrantes en cada placa y se incubaron a 35°C/48 h.

e) Identificación

Para la identificación de *Listeria spp.* se realizaron pruebas bioquímicas de catalasa, reducción de nitratos, fermentación de manitol, ramnosa y xilosa, movilidad en medio de cultivo SIM y prueba de hemólisis.⁸

f) Confirmación con API *Listeria*

Los cultivos positivos para especies de *Listeria spp.* se confirmaron con el sistema API *Listeria* (bioMérieux Marcy l'Etoile France).

2. Aislamiento de *Listeria spp.* a partir de materia prima

La materia prima la proporcionó una planta productora de alimentos congelados, y consistió en productos de origen vegetal y de origen animal, los cuales fueron transportados bajo refrigeración hasta el laboratorio. Se colocaron a temperaturas de refrigeración de 4 a 8°C, durante 18 h, para descongelación antes de analizarlos. El protocolo para el aislamiento de especies de *Listeria* en este tipo de muestras se realizó bajo el mismo método establecido para los alimentos.

3. Aislamiento de *Listeria spp.* de aire interno

Con una bomba de vacío, se bombeó aire del interior de la planta para atraparlo en un matraz con 100 mL de caldo de soya tripticasa durante 30 minutos. Al cabo de este tiempo se quitó el dispositivo de vacío, se colocó una torunda al matraz y se transportó bajo refrigeración al laboratorio, en donde se procedió a su incubación a 35 °C por un lapso de 24 h. Este proceso se consideró como pre-enriquecimiento no selectivo para continuar con el método exactamente igual que para alimentos.

4. Aislamiento de *Listeria spp.* de agua potable

La toma de muestra del agua potable se realizó de acuerdo a los procedimientos mencionados en la Norma Oficial Mexicana, NOM 014-SSA1-1993⁹ (procedimientos sanitarios para el muestreo de agua

para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento públicos y privados). Se colectaron 100 mL de la muestra en bolsas Whirl Pak^{MR}, se transportó al laboratorio en condiciones de refrigeración y se inoculó en 150 mL de CSTEL adicionado con 1% de piruvato de sodio para pre-enriquecimiento, durante 24 h a 35°C. A partir de este punto el procedimiento se continuó de la misma forma que para el aislamiento de la bacteria a partir de alimentos.

5. Aislamiento de *Listeria spp.* de agua residual

Para este análisis se instalaron hisopos de Moore estériles en las diferentes canaletas de drenajes de la planta y se dejaron por un lapso de 12 h. Se extrajeron y se colocaron en bolsas estériles Whirl Pak^{MR} para ser transportadas al laboratorio bajo las mismas condiciones que las demás muestras. Se adicionaron 100 mL de CSTEL previamente suplementado con 1% de piruvato de sodio a cada una de las bolsas y éstas se colocaron en un portabolsas para su incubación a 35°C por 24 h. A partir de este punto, el procedimiento se continuó de la misma forma que para el aislamiento de la bacteria a partir de alimentos.

6. Aislamiento de *Listeria spp.* de superficies inertes

Para la colecta de muestras de superficie, como canaletas, mesas de trabajo, utensilios, paredes, pisos y equipo en general, se utilizó el dispositivo Whirl Pak «Speci Sponge»^{MR} consistente en una esponja estéril, la cual se humedeció en 6 mL de solución salina al 0.85% y se pasó a través de la superficie seleccionada. La esponja se colocó en su bolsa y se transportó bajo las mismas condiciones que las anteriores muestras. El procedimiento de aislamiento fue exactamente igual al de los alimentos.

7. Aislamiento de *Listeria spp.* de superficies vivas (manos de manipuladores)

Este análisis se realizó con el Whirl Pak «Speci Sponge»^{MR}, cuya esponja se humedeció en 6 mL de solución salina al 0.85% para frotar la palma y dorso

de las manos de las operadoras en turno de la planta y, posteriormente, se depositó en su respectiva bolsa para su transporte al laboratorio en donde se llevó a cabo su análisis de igual forma que las muestras anteriores.

Resultados

Se analizaron 580 muestras: 90 de materias primas, 245 de producto terminado, 30 de superficies vivas (manos), 125 de superficies inertes, 30 de agua potable, 30 de agua residual y 30 de ambiente, colectadas en una planta procesadora de alimentos congelados ubicada en el área metropolitana de la ciudad de Monterrey, N. L., para determinar la incidencia de especies de *Listeria*.

Las muestras estudiadas correspondientes a la materia prima consistieron en 30 productos de origen animal, que incluyeron: carne para tacos, carne molida para hamburguesa, carne de pollo para hamburguesa, salchichas y otros; asimismo, 30 productos de origen vegetal como: zanahorias, chiles, cebollas, etc., y 30 productos de origen lácteo, representado por quesos. Se detectó la presencia de *L. monocytogenes* en la materia prima de origen animal específicamente en la carne molida, lo cual representó un 1.66% del total de muestras analizadas. De igual manera, el mismo porcentaje de prevalencia se detectó en carne de ave para *L. innocua*. En el resto de las muestras analizadas no se detectó ninguna especie del género *Listeria*, por lo cual el porcentaje de incidencia se consideró como 0% en materia prima de origen vegetal y productos lácteos, como se muestra en la tabla I.

Los productos terminados fabricados en la planta y analizados en este estudio fueron aquellos producidos con relleno de queso (enchiladas, quesadillas); los fabricados con relleno de carne de res (tacos, hamburguesas); los alimentos producidos con carne de pollo como ingrediente principal (emparedado, hamburguesa) y emparedados de jamón con queso. En este tipo de muestras se detectó a *L. monocytogenes* en los alimentos con relleno de queso, específicamente en enchiladas, donde el porcentaje de incidencia correspondió a 1.66%, en base a la cantidad de muestras (60) que se estudiaron para este producto en particular. *L. innocua* se

detectó solamente en enchiladas, quesadillas y emparedados de pollo en un 12, 10 y 8%, respectivamente (tabla I).

Situación muy similar se obtuvo al analizar las muestras de superficies incluidas en el estudio, y que consistieron en manos de manipuladores y en equipo de producción de la planta, en las cuales no se detectó a *L. monocytogenes*, pero sí a *L. innocua*, la cual se presentó en una sola muestra del personal (manos) lo que representó un 3% de incidencia, y en las superficies inertes del área de producción se detectó a esta especie en un 36% (tabla I). En este tipo de muestras se incluyeron las canaletas de drenaje, donde se obtuvo el mayor porcentaje de *L. innocua*, los sistemas de conservación de producto terminado a baja temperatura y las líneas de producción.

En la búsqueda del patógeno en 30 muestras de agua potable y 30 de agua residual colectadas de diferentes tomas y canaletas de la planta no se encontró a *L. monocytogenes*, sin embargo *L. innocua* se detectó en el 100% de las muestras de agua residual (tabla I); tampoco se pudo constatar la presencia de especies en el ambiente de producción de la planta, cuando se realizó la determinación en las muestras de aire que fueron colectadas en el interior de la misma.

Conclusiones

1. *L. monocytogenes* se detectó en 1.66% en carne molida para hamburguesa y en 1.66% en enchiladas.
2. *L. innocua* se presentó en 12% en enchiladas, 10% en quesadillas y 8% en emparedados de pollo.
3. Las muestras de agua potable no revelaron la presencia de especies de *Listeria*.
4. *L. innocua* se presentó en el total de las muestras de agua residual (100%).
5. Se detectó en un 3% la presencia de *L. innocua* en manos de manipuladores.
6. En las superficies inertes: equipo de la planta en general se detectó a *L. innocua* en un 36%.
7. Del total de las muestras (580); *L. monocytogenes* se detectó en un 0.34% y *L. innocua* en un 15.86%.

Tabla I. Incidencia de *Listeria spp.* en una planta productora de alimentos congelados.

Muestras	No. de muestras	<i>L. monocytogenes</i>	Incidencia	<i>L. innocua</i>	Incidencia
Enchiladas	60	1	1.66 %	7	12 %
Quesadillas	60	0	0 %	6	10 %
Tacos de carne	25	0	0 %	0	0 %
Hamburguesa de carne	25	0	0 %	0	0 %
Hamburguesa de pollo	25	0	0 %	0	0 %
Emparedado de pollo	25	0	0 %	2	8 %
Emparedado de jamón	25	0	0 %	0	0 %
Materia prima animal ¹	60	1	1.66 %	1	1.66 %
Materia prima vegetal ²	30	0	0 %	0	0 %
Agua potable	30	0	0 %	0	0 %
Agua residual	30	0	0 %	30	100 %
Manipuladores	30	0	0 %	1	3 %
Equipo	125	0	0 %	45	36 %
Ambiente ³	30	0	0 %	0	0 %
Total	580	2	0.34 %	92	15.86%

¹ Carne para tacos, carne molida para hamburguesa, carne de pollo para hamburguesa, salchichas, queso; ²zanahorias, chiles, cebollas, elote, chicharo, cilantro; ³ambiente interno de la planta.

Resumen

Se colectaron asépticamente muestras de aire, agua potable, agua residual, superficies vivas e inertes, materia prima y producto terminado para investigar la incidencia de *Listeria spp.*, de acuerdo al método establecido por la NOM-143-SSA1-1995.⁷ Esto nos llevó a la obtención de 1.66% de incidencia de *L. monocytogenes* en materia prima, 1.66% en producto terminado, 30% de *L. innocua* en producto terminado y en materia prima sólo 1.66%. En las superficies vivas e inertes se detectó un 3% y 36% de incidencia para *L. innocua*, respectivamente, y ausencia de *L. monocytogenes*. En agua potable y aire no se detectaron especies de *Listeria*, mientras que en agua residual se presentó 100% para *L. innocua*

y 0% para *L. monocytogenes*. Esto indica que existe escasa incidencia del patógeno en estudio en la planta, pero también existen condiciones adecuadas para que se pueda establecer en la misma, como lo demuestra la presencia de la especie saprófita *L. innocua* en varias de las muestras que se analizaron.

Palabras clave: Listeriosis, *Listeria monocytogenes*.

Abstract

Samples of air, potable water, residual water, live and inert surfaces, raw materials, and finished products were collected in order to investigate the incidence of *Listeria spp.*, in accordance with the methods established by the norm NOM-143-SSA1-1995. This led us to find an incidence of 1.66% of

L. monocytogenes in both raw materials and finished products, as well as a 30% incidence of *L. innocua* in finished products with a 1.66% incidence in raw materials. No species of *Listeria* were found in potable water, whereas 100% of residual water contained *L. innocua* with no findings of *L. monocytogenes*. This indicates that there is a low incidence of the studied pathogen in the plant, but also proves that there are suitable conditions in which the pathogen can grow, as demonstrated by the presence of the saprophyte specie *L. innocua* in a number of the analyzed samples.

Keywords: Listeriosis, *Listeria monocytogenes*.

Referencias

1. Frazier, W.C., D.C. Westhoff. 1993. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A.
2. Knabel, S.J. 1995. Foodborne Illness: role of home food handling practices. Scientific Status Summary. Food Technol. 49: 114-132.
3. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1994. El sistema de análisis de riesgos y puntos críticos, su aplicación a las industrias de alimentos. Ed. Acribia, S.A. pp. 213-218.
4. Aureli, P. 1998. Las infecciones y las intoxicaciones alimentarias. Revista Filo Dieto Italia, 4: 54.
5. Lovett, J. and Twedt R.M. 1988. Bacteria associated with foodborne diseases: *Listeria*. Scientific Status Summary. Food Technol. 42: 16-24.
6. Roser, E.T. and Marth, E.H. 1999. Listeriosis in humans. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. New York: Marcel Dekker, pp. 75-95.
7. NOM-143-SSA1-1995. Métodos de pruebas microbiológicas para alimentos. Determinación de coliformes fecales por la técnica de NMP y determinación de *L. monocytogenes*.
8. Holt J.G., Krieg N. R., Sneath P.H.A., Staley J.T, and Williams S.T. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth edition. Williams & Wilkins, 1994.
9. NOM-014-SSA1-1993. Procedimientos sanitarios para el muestreo de agua para uso y consumo humano en sistemas de abastecimiento de agua públicos y privados.
10. Secretaría de Salud. 1993. Manual de aplicación del análisis de riesgos, identificación y control de puntos críticos, pp. 1-50.
11. Tecnología de los alimentos, industria y mercado. 1998. Conciencia limpia.

Recepción: 16 de mayo de 2005
Aceptación: 28 de agosto de 2005