

# AISLAMIENTO DE *Listeria monocytogenes* EN ATÚN FRESCO EXPEDIDO EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, VENEZUELA

## Isolation of *Listeria monocytogenes* from Fresh Tuna Fish Expended in Cumana City, Venezuela

Rosa E. Martínez N. y Luz Bettina Villalobos de Bastardo

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Postgrado en Biología Aplicada, Cerro El Medio, Cumaná, Estado Sucre.

E-mail: rosamnazaret@hotmail.com. Telf: 0293-4302270; 0293-4332146

### RESUMEN

*Listeria monocytogenes* se ha reportado como el agente causal de varios brotes de listeriosis en humanos. Los alimentos implicados hasta el momento han sido los lácteos, vegetales y cárnicos. Por otra parte, los alimentos pesqueros están siendo considerados como vehículos posibles de la bacteria. En el presente estudio se reporta el aislamiento de cepas de *Listeria monocytogenes* en atún (*Thunnus* sp) expandido en puntos de venta en Cumaná, Venezuela. Se siguió la metodología descrita por la Food and Drug Administration y las pautas descritas por Bubert y col. para el desarrollo de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), a partir de colonias aisladas de medios de enriquecimiento y medios selectivos suplementados con antibióticos. Se analizaron 33 muestras de esa especie de pescado en estado fresco y 24 en estado salado. Por el método convencional, tres muestras de atún fresco fueron positivas para el aislamiento de *Listeria monocytogenes* (3,75%) y cinco positivas para el aislamiento de las especies: *L. welshimeri* (2,5%), *L. grayi* (2,5%) y *L. ivanovii* (1,25%). La presencia de *L. monocytogenes* fue confirmada por un producto de amplificación de PCR, de aproximadamente 600 pares de bases, corroborando que la bacteria se encuentra en una de las especies comerciales de mayor consumo en el país.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, aislamientos, alimentos, atún.

### ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* has been reported as the causal agent of several listeriosis outbreaks in humans. The foods implicated until recently have been the dairy products,

vegetables and meats. Now, on the other hand, fish products are being considered as possible vehicles of the bacteria. This study report the isolation of strains of *Listeria monocytogenes* in tuna fish (*Thunnus* sp) expended in retail stores in Cumaná city, Venezuela. The methodology used was the one recommended by the Food and Drug Administration and Bubert et al. for Polymerase Chain Reaction (PCR) using an enrichment media and selective media supplemented with antibiotics. By conventional method three positive strains for *L. monocytogenes* (3.75%) were identified in three samples and five for *L. welshimeri* (2.5%), *L. grayi* (2.5%) and *L. ivanovii* (1.25%). The presence of *L. monocytogenes* was confirmed by PCR amplification product of approximately 600 base pairs, which confirmed that the bacteria is present in one of the commercial species of high consumption in the country.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, isolations, foods, tuna fish.

### INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* es un bacilo Gram positivo, psicrófilo y halotolerante, asociado a brotes alimenticios, ampliamente distribuido en el ambiente y en alimentos crudos [1]. Se puede aislar del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pescados, pollos frescos y congelados, vegetales frescos y congelados, quesos, leche no procesada, desechos de mataderos, así como del tracto digestivo de humanos y animales asintomáticos [2].

La listeriosis es una infección que tiene como punto de entrada el intestino, sin embargo, no se conoce la dosis infecciosa. El período de incubación puede variar de un día a varias semanas. Las cepas virulentas se caracterizan por producir una toxina citolítica y hemolítica llamada listeriolisina O, y son capaces de producir septicemia seguida por la infección de otros órganos como el sistema nervioso central, el corazón, los

ojos y pueden inclusive invadir los fetos de las mujeres embarazadas. En adultos sanos, la listeriosis normalmente nunca se desarrolla más allá de la fase entérica, que puede no presentar síntomas o tener sólo síntomas leves de tipo resfriado [3].

*Listeria monocytogenes* no ha sido vinculada con mucha frecuencia a brotes de listeriosis por alimentos de origen marino, pero un producto listo para comer a base de salmón se encontró como agente transmisor de un pequeño brote en Suecia [4]. Al igual que un salmón ahumado en frío [5, 6]. La prevalencia de *L. monocytogenes* en pescado crudo es baja desde un 0 a 1% a 10% [7, 8, 9]. Recientemente en un estudio de una planta procesadora de bagre crudo, entero y procesado, se encontró que era en el pescado crudo donde más se encontraba *L. monocytogenes* [10].

Como contribución a la documentación de este patógeno en el caso particular de los alimentos marinos, se realizó una investigación para detectar la presencia de especies del género *Listeria* en atún rojo fresco y salado. Para confirmar la presencia de *L. monocytogenes* como especie patógena al humano, se utilizaron técnicas de biología molecular [11].

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 33 muestras de atún rojo (*Thunnus sp*) en estado fresco y 24 en estado salado, las cuales fueron colectadas en los puntos de venta del mercado municipal de la ciudad de Cumaná, Venezuela. Una vez en el laboratorio cada muestra se analizó por separado, siguiendo las recomendaciones del Manual Analítico de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos [12] para el aislamiento e identificación convencional de *L. monocytogenes*, por pruebas rápidas API Listeria y las pautas según Bubert y cols. [13] para la identificación por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

### La identificación contempló los siguientes análisis

Enriquecimiento: 25 g de cada muestra, se colocaron en Caldo LEB (Oxoid, Basingstoke-England), suplementado con acriflavina, ácido nalidíxico y cicloheximida. Se incubaron a 30°C por 24 horas. Se tomó una alícuota de 0,1 mL y se colocó en un segundo caldo LEB (Oxoid) por 24 horas adicionales.

Aislamiento: del segundo caldo de enriquecimiento se realizaron siembras por estrías hasta agotamiento en la superficie de medios de cultivo selectivos Oxford (Oxoid) y Palcam (E. Merck - Germany), ambos suplementados con antibióticos y contenidos en placas de Petri. Se incubaron las placas a 37°C por 24 a 48 horas. Transcurrido las 48 horas, se procedió a examinar las placas para obtener colonias sospechosas. En el medio Oxford, no se logró aislar ninguna colonia característica. En cambio en el medio Palcam, se aisló colonias presuntivas de aproximadamente 2 mm de diámetro, de color verde grisáceo, con un centro hundido de color negro y un halo negro a su alrededor. Las colonias sospechosas se sembraron

en agar tripticasa de soya (Oxoid) con 0,6% de extracto de levadura, para su posterior identificación.

Identificación convencional: se realizó mediante las pruebas bioquímicas siguientes: Hemólisis, catalasa, oxidasa, hidrólisis de esculina, motilidad a 4° y 25°C, producción de indol, Voges Proskauer, rojo de metilo, motilidad en "vuelta de carnero", TSI, fermentación del manitol, xilosa y ramnosa, reducción de nitrato. Una vez confirmado el género, las cepas positivas fueron evaluadas por pruebas bioquímicas miniaturizadas en una galería API Listeria (BioMerieux-Zhuo Pharma). Se utilizó una cepa control proveniente del CVCM 446 [14].

Identificación por (PCR): Las colonias identificadas como *L. monocytogenes* por pruebas bioquímicas, fueron sometidas a un ensayo de PCR. Para el método, se tomó una porción de las colonias previamente identificadas, y se procedió a la extracción y purificación del ADN total de las muestras. Esta se realizó por medio del kit de extracción de ADN genómico Wizard (Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante. Una vez purificado el ADN y cumplidas las 24 horas de rehidratación, se procedió a realizar la amplificación por PCR utilizando las combinaciones de los primers MonoA(5'-CAAACCTGGTAACACAGCTACT-3') y MonoB(5'-TGGGTCATCGGTGTGATCGTC-3') (Sigma Genosys-U-SA), para la identificación específica del serotipo *L. monocytogenes* [13]. La especificidad de la prueba fue evaluada con una cepa de referencia de *L. monocytogenes* certificada por el Centro Venezolano de Colección de Microorganismos (CVCM) [14]. El programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos para la desnaturalización inicial, 35 ciclos a 94°C por 5 minutos para la desnaturalización, 58°C por 30 segundos para la hibridación de los primers, 72°C por 45 segundos para la extensión y 1 ciclo a 72°C por 10 minutos para la extensión final. Los productos amplificados fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, en buffer TAE 1X a 80 V por 35 minutos. El ADN fue visualizado en un transiluminador ultravioleta usando coloración con bromuro de etidio.

## RESULTADOS Y DISCUSION

El presente estudio confirmó la presencia de *L. monocytogenes* en atún rojo (*Thunnus sp*) que se comercializa en la zona capitalina del estado Sucre. De un total de 57 muestras de atún fresco y salado, se aislaron 80 cepas sospechosas de pertenecer al género *Listeria*. De las 80, se identificó 3 cepas como *L. monocytogenes*, aisladas de tres muestras diferentes de atún fresco (3,75%), 2 cepas como *L. welshimeri* (2,5%), 2 como *L. grayi* (2,5%) y 1 como *L. ivanovii* (1,25%), cada una proveniente de cinco muestras más de atún fresco. Las muestras saladas de atún, mostraron cero incidencia de *Listeria spp* (FIG.1). Por la identificación convencional, las cepas aisladas mostraron las siguientes características: Gram+, motilidad en vuelta de carnero; crecimiento en paraguas a 25°C; betahemólisis (en el caso de *L. monocytogenes*); esculina +, catalasa +, oxidasa - urea -;

TSI a/a; glucosa O/F +/+ y MR-VP +/+. Por el sistema de identificación API los resultados fueron corroborados, evidenciándose la presencia de *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*, *L. grayi* y *L. ivanovii*, en el mismo porcentaje hallado por las pruebas bioquímicas convencionales.

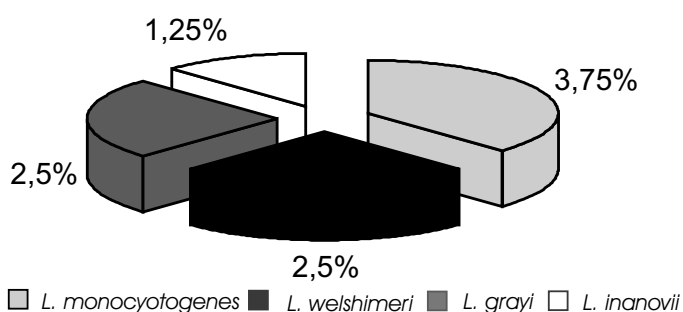
Los aislamientos frecuentes a partir del pescado [15, 16] y la demostración del potencial de proliferación en salmón ahumado en frío (4°C) [17], son pruebas de que el pescado puede ser importante en la transmisión de *L. monocytogenes*. En Japón (1992) evaluaron la incidencia de especies de *Listeria* en ventas de comidas, encontrando que un 56,6% de las muestras de carne, pescados y productos vegetales analizados, estaban contaminados con especies de *Listeria*, siendo *L. monocytogenes*, la especie que se presentó con mayor frecuencia (36%) [18]. En un estudio realizado en carnes y alimentos marinos en la ciudad de Puerto España, Trinidad, se detectó una prevalencia en pescados del 14,8% para especies de *Listeria*, observándose un 1,9% de cepas positivas de *L. monocytogenes*. [19], valores próximos a los reportados en el presente trabajo.

Según indica Embarek y Huss [17], es poco común el aislamiento de *L. monocytogenes* en agua de mar a menos que la costa esté sujeta a contaminación por fuentes industriales, humanas o de animales.

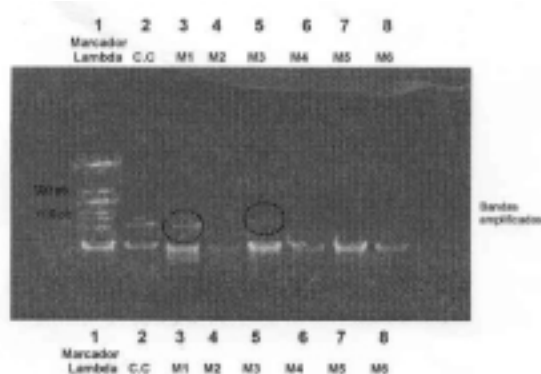
Por un proceso de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se confirmó la presencia de *L. monocytogenes* en atún rojo a partir de primers específicos para la identificación de esta especie. Los resultados indicaron que 2 de las 3 cepas aisladas e identificadas por el método convencional como *L. monocytogenes*, presentaron el mismo patrón de corrida electroforética que la cepa certificada, mostrando un producto de amplificación de aproximadamente 600 pares de bases (FIG. 2).

Es importante señalar que en Venezuela no se conoce trabajo que haya reportado la presencia de *Listeria monocytogenes* en productos pesqueros. En el caso particular del atún rojo que se expende en la ciudad de Cumaná, al ser colectado en zonas muy alejadas de la costa, se hace difícil dilucidar la posible fuente de contaminación y descartar si su origen es por exposición al microorganismo en el área donde fueron capturados, o por malas prácticas de manipulación y falta de higiene por parte de los expendedores.

Según la norma de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos [12], la tolerancia de *L. monocytogenes* debe ser 0 UFC/g en pescados listos para consumir, bien sean frescos, congelados, salados o ahumados. Aunque en el estado Sucre no se exige el cumplimiento de normas de control de calidad, por parte de todos los expendios de pescados existentes, es importante tomar en cuenta que un 3,75% de incidencia de *L. monocytogenes* en pescado fresco, es un valor significativo, en el sentido que pone al descubierto un riesgo potencial de contraer la listeriosis.



**FIGURA 1. ESPECIES DE *Listeria* AISLADAS DE ATÚN FRESCO EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE, VENEZUELA.**



**FIGURA 2. IDENTIFICACIÓN POR PCR, CONTENIENDO LOS PRIMERS MONO A Y MONO B DE *Listeria monocytogenes* AISLADAS DE ATÚN FRESCO EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, ESTADO SUCRE, VENEZUELA.**

## CONCLUSIONES

- La identificación convencional arrojó un total de 3 cepas positivas a la especie *L. monocytogenes*, 2 a *L. welshimeri*, 2 a *L. grayi* y 1 a la especie *L. ivanovii*, en muestras de atún rojo (*thunnus sp*) fresco.
- Las muestras saladas de atún rojo, mostraron cero incidencia de *Listeria spp*.
- La identificación por galerías API, corroboró los resultados hallados por pruebas bioquímicas convencionales, evidenciando la presencia de cuatro especies de *Listeria*.
- La técnica de PCR mostró un grado de sensibilidad excelente, al confirmar dos cepas positivas de *Listeria monocytogenes*, de las tres identificadas por el método convencional en atún fresco.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] SEELIGER, H.P.R.; JONES, D. *Listeria*. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J.G. Holt (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, Vol 2. Williams and Wilkins, Baltimore, Md. 1235 - 1245 pp, 1986.

- [2] OTEO, J.; ALÓS, J.I. *Listeria* y listeriosis. **Informe del Control de Calidad SEIMC**. Servicio de Microbiología. Hospital de Móstoles. Madrid. 4pp, 1999.
- [3] VÁZQUEZ-BOLAND, J.A.; KUHN, M.; MERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. *Listeria*: pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clin. Microbiol. Rev.** 14: 584-640, 2001.
- [4] RORVIK, L.M.; AASE, E.; ALVESTAD, T.; CAUGANT, D.A. Molecular epidemiology survey of *Listeria monocytogenes* in seafoods and seafood processing plants. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 4779-4784, 2000.
- [5] ERICSON, H.; EKLÖW, A.; DANIELSSON-THAM, K.L.; LONCAREVIC, S.; MENTRING, O.; PERSSON, I.; UNNERSTAD, H.; THAM, W. An outbreak of listeriosis suspected to have been caused by rainbow trout. **J. Clin. Microbiol.** 38: 2904-2907, 1997.
- [6] MIETTINEN, M.K.; SIITONEN, A.; HESKANEN, P.; HAAJANEN, H.; BJÖRKBROTH, K.J.; KORKEALA, H.J. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold smoked rainbow trout. **J.Clin. Microbiol.** 37: 2358-2360, 1999.
- [7] AUTIO, T.; HIELM, S.; MIETTINEN, M.; SJOBERG, A.M.; AARNISAIN, K.; BJORKROTH, J.; MATILLASANDHOLM, T.; KORKEALA, H. Sources of *Listeria monocytogenes* contamination in a cold-smoked rainbow trout processing plant detected by pulsed-field gel electrophoresis typing. **Appl. Environ. Microbiol.** 65: 342-345, 1999.
- [8] JOHANSSON, T.; RANTALA, L.; PALMU, L.; HONKANEN-BUZALSKI, T. Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum packed fish products and in a production plant. **Int. J. Food Microbiol.** 42: 127-131, 1999.
- [9] JEMMI, T.; KEUSH, A. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish farms and fish-smoking plants. **Food Microbiol.** 11: 309-316, 1994.
- [10] THIMOTHE, J.; WALKER, J.; SUVANICH, V.; GALL, K.L.; MOODY, M.W.; WIEDMANN, M. Detection of *Listeria* in crawfish processing plants and in raw, whole crawfish and processed crawfish (*Procambarus spp.*). **J. Food. Prot.** 65: 1735-1739, 2002.
- [11] NORTON, D.; McCAMEY, A.; GALL, K.; SCARLETT, J.; BOOR, K.; WIEDMANN, M. Molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. **appl. Environ. Microbiol.** 67: 198-205, 2001.
- [12] FOOD AND DRUG ADMINISTRACIÓN. **Bacteriological Analytical Manual (Bam)**. Chapters 10 and 11. 7th Ed. Washington D.C.23 pp.1992.
- [13] BUBERT, A.; HEIN, I.; RAUCH, M.; LEHNER, A.; BYOUNGSU, Y.; WERNER, G.; WAGNER, M. Detection and differentiation of *Listeria* spp. By a single reaction based on multiplex PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (10): 4688-4692, 1999
- [14] CENTRO VENEZOLANO DE COLECCIONES DE MICROORGANISMOS. (CVCM). Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela. 1996.
- [15] WEAGANT, S.D.; SADO, P.N.; COLBURN, K.G. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. **J. Food Prot.** 51: 655-657, 1989.
- [16] RORVIK, L.M.; YNDESTAD, M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. **Int. J. Food Microbiol.** 13: 97-104, 1991.
- [17] BEN EMBAREK, P.K.; HUSS, H.H. Growth of *Listeria monocytogenes* in lightly preserved fish products. In **Quality assurance in the fish industry**. Eds.: H.H. Huss, M. Jacobsen and J. Liston. Elsevier Science Publishers, 293-304. pp 1992.
- [18] RYU, CH.; IGIMI, S.; INOUE, S.; KUMAGAI, S. The incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. **Int. J. Food. Microbiol.** 16: 157-160, 1992.
- [19] ADESIYUN, A. Prevalence of *Listeria spp.*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, and toxigenic *Escherichia coli* in meat and seafoods in Trinidad. **Food Microbiol.** 10:395-403,1993.