

## Presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en alimentos de origen animal en Costa Rica

Alejandra Reuben, Hellen Treminio, María Laura Arias y Carolina Chaves

Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica

**RESUMEN.** Se determinó la presencia de *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en dos tipos de alimento de origen animal. Para ello se recolectaron 100 muestras de leche no pasteurizada provenientes de las principales zonas productoras del país, de las cuales 90 fueron proporcionadas por una industria lechera y las restantes fueron adquiridas en diferentes lecherías. También se analizaron 100 muestras de menudos de pollo, obtenidas al azar en los principales mercados del área metropolitana, incluyendo carnicerías detallistas, supermercados y ferias del agricultor. Para el análisis de las muestras se siguió el método descrito por FDA en 1995. *Escherichia coli* O157:H7 fue investigada en ambos alimentos, mientras que *L. monocytogenes* fue evaluada únicamente en leche cruda y *Salmonella* spp. solamente en pollo. Se aislaron cinco cepas de *E. coli* O157:H7, de las cuales tres provenían de menudos de pollo y dos de leche cruda. Además se encontró un 15% de positividad por *Salmonella* spp. en las muestras de pollo y un 3% de positividad por *L. monocytogenes* en las muestras de leche. Los aislamientos realizados reiteran la importancia de un procesamiento adecuado de los productos de origen animal para disminuir la probabilidad de transmisión de agentes patógenos y así prevenir el desarrollo de las patologías causadas por estos. En este contexto, la implementación de normas HACCP y de Buenas Prácticas de Manufactura en la industria alimentaria siguen siendo las principales medidas de control y garantía de inocuidad.

**Palabras clave:** *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, leche, menudos de pollo.

**SUMMARY.** Presence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food from animal origin in Costa Rica. The presence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp was analyzed in two kinds of food from animal origin in Costa Rica. 100 samples of non pasteurized milk, from the principal producing zones of the country, and 100 samples of chicken giblets, purchased in retail markets, were analyzed according to the methodology described by Food and Drug Administration, 1995. *Escherichia coli* O157:H7 was analyzed in both kinds of food, while *L. monocytogenes* was evaluated in raw milk and *Salmonella* spp. in chicken giblets. Five strains of *E. coli* O157:H7 were isolated, three of them coming from chicken giblets and the other two from raw milk. 15% positivity for *Salmonella* spp. was found in chicken giblets samples and 3% positivity for *L. monocytogenes* in raw milk samples. The results obtained show the importance of the adequate processing of food from animal origin in order to decrease the potential transmission of pathogenic agents. The introduction of Hazard Analysis Critical Control Points system (HACCP) and Good Manufacturing practices in food industry keep on being the principal control measures and inocuity warranty.

**Key words:** *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. raw milk, chicken giblets.

### INTRODUCCION

De acuerdo con las últimas estadísticas presentadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS), las enfermedades de transmisión alimentaria son de 300 a 350 veces más frecuentes de lo indicado en reportes anteriores. Entre los principales patógenos involucrados en estas enfermedades se encuentran *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp., que junto con *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *Toxoplasma gondii*, son causantes de 3,3 a 12,3 millones de casos en Estados Unidos y de alrededor de 3900 muertes. A esto se suman los altos costos para el sector salud, que ascienden los treinta mil millones de dólares al año (1).

La infección causada por *Escherichia coli* O157:H7 puede ser letal y está frecuentemente asociada a los más importantes y mejor documentados casos de enfermedades de transmisión alimentaria alrededor de todo el mundo (2). Sin embargo, debido a que los métodos de detección no son usados ampliamente, este serotipo ha sido poco estudiado y existe un sub-registro importante en cuanto a su asociación con patología en humanos (3). Además, debido al reciente descubrimiento de este organismo como agente patógeno, no se cuenta con reportes de su aislamiento en países tropicales (4).

En Costa Rica no se ha determinado su presencia en alimentos de riesgo, debido a su baja incidencia y a su difícil aislamiento. Considerando la importancia actual de esta

bacteria en salud pública y el limitado número de investigaciones realizadas en torno a ella, en este trabajo se pretende evaluar su presencia en alimentos descritos como posibles vehículos de transmisión.

Por otro lado, *Listeria monocytogenes* es de gran importancia entre los patógenos asociados a alimentos, particularmente porque se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza y ha sido aislada de muchas especies de animales y diferentes alimentos. Se han descrito brotes asociados a ensalada de repollo, quesos no pasteurizados, leche pasteurizada y diversos productos cárnicos entre otros (5).

En nuestro país, los estudios realizados en productos lácteos con esta bacteria revelan la importancia de realizar futuras investigaciones para intentar su aislamiento a partir de leche cruda y durante la producción de queso (6-8).

Uno de los productos animales más asociados a brotes alimentarios es la carne de pollo, la cual presenta características que contribuyen al desarrollo de bacterias patógenas, como *Salmonella* spp., causante de cuadros de enteritis, septicemia y aborto en animales y de gastroenteritis y fiebre tifoidea en el ser humano (9).

Los serotipos *S. pullorum* y *S. gallinarum* son flora normal de estas aves, encontrándose en tracto digestivo, superficie de piel y plumas. A pesar de que éstas no provocan patología en las aves ni en el humano, se ha asociado su eliminación con un incremento en la posibilidad de contaminación con *S. enteritidis*, que es agente causal de gastroenteritis (10). Además otros serotipos como *S. typhi* y *S. paratyphi*, agentes de fiebre entérica, se han relacionado con la ingesta de comida y/o agua contaminada (11).

La ausencia de esta bacteria forma parte de muchas de las normas alimentarias de productos de venta comercial, destacando entre ellos la carne de pollo. En Costa Rica, según un estudio realizado en el año 2000, la incidencia de *Salmonella* spp. en las plantas de procesamiento de carne de pollo no es significativa. Sin embargo, la calidad sanitaria del producto puede verse alterada después de su procesamiento.

El consumo de vísceras de pollo (hígado y mollejas, entre otros) forma parte de la cultura de muchos países latinoamericanos, debido a su bajo costo y alto contenido proteínico (12). Por tanto, es necesario evaluar la presencia de esta bacteria en este tipo de producto listo para la venta al consumidor.

Dado lo anterior, se pretende con este trabajo determinar la presencia de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. en muestras nacionales de leche no pasteurizada y vísceras de pollo (menudos) con el fin de determinar su impacto dentro de la salud pública nacional.

## MATERIAL Y METODOS

### Origen de las muestras

Se analizaron 100 muestras de leche no pasteurizada provenientes de las principales zonas productoras del país. Noventa de ellas fueron proporcionadas por una industria lechera nacional, y las otras diez muestras provenían de lecheros independientes.

Además, se evaluaron 100 muestras de menudos de pollos, obtenidas al azar en los principales mercados del área metropolitana, incluyendo carnicerías detallistas, supermercados y ferias del agricultor.

Todas las muestras fueron recolectadas en bolsas estériles debidamente identificadas y posteriormente transportadas en frío al Laboratorio de Microbiología de Alimentos de la Universidad de Costa Rica en un tiempo menor a 4 horas y en frío.

### Análisis microbiológico

Para el análisis microbiológico de las muestras se siguió el método descrito en el Manual de Microbiología, Food and Drug Administration, 1995 (13).

### Aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7

Se enriquecieron 25 mL de leche o 25 g de menudos de pollo en 225 mL de caldo EC + novobiocina. Se incubó a 35°C por 24 h. Posteriormente, se realizó un aislamiento selectivo utilizando agar MacConkey sorbitol (Oxoid), incubándose a 35°C por 24h. Las colonias sorbitol negativas fueron aisladas en agar MacConkey suplementado con 4 metil umbeliferil  $\beta$  D glucurónido (MUG) 0,2 g/L (Oxoid) incubando bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Las colonias sorbitol negativas y MUG negativas fueron evaluadas bioquímicamente, utilizando las pruebas de TSI, urea, oxidasa, catalasa, IMVIC, lisina descarboxilasa y API 20E (Biomerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) La confirmación serológica se realizó por aglutinación en látex con antisueros monoclonales específicos para el antígeno O 157 (Unipath, Oxoid, US) y el antígeno 117 (Difco).

### Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en leche no pasteurizada

Se pre-enriquecieron 25 mL de la muestra con 225 mL de caldo UVM, incubando 24 h a 35°C. Posteriormente, se llevó a cabo un enriquecimiento selectivo utilizando caldo Frazer, bajo las mismas condiciones de incubación. El aislamiento selectivo se realizó utilizando agar Oxford, incubando 24 h a 35°C. Las colonias sospechosas fueron confirmadas mediante las pruebas de Gram, oxidasa, catalasa, movilidad, fermentación de ramnosa y xilosa y la prueba de CAMP.

### Aislamiento de *Salmonella* spp. en menudos de pollo

Se pre-enriquecieron 25 g de la muestra en 225 mL de agua peptonada estéril (APE) 0,1%, incubando 24 h a 35°C. El enriquecimiento selectivo se realizó utilizando caldo tetrionato y caldo selenito, incubando 24 h a 43°C y 35°C respectivamente. El aislamiento selectivo se realizó en los agares XLD y Hecktoen, incubando 24 h a 35°C. La confirmación bioquímica de las colonias sospechosas se realizó utilizando el API 20E y la confirmación serológica usando anticuerpos monoclonales.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los productos de consumo de origen animal han sido descritos como fuente primaria de contaminación por diversas bacterias patógenas, incluyendo *E. coli* O157:H7 (8). Por tanto, la determinación de estas bacterias en ellos es esencial para la evaluación epidemiológica de las patologías provocadas por una posible infección y su impacto en salud pública. Con respecto a *E. coli* O157:H7, y a pesar de que su aislamiento se ha notificado en diferentes partes del mundo, en los países tropicales existen muy pocos reportes al respecto (14).

En el presente trabajo se encontró un 3% de positividad por esta bacteria a partir de las muestras de menudo de pollo analizadas y un 2% de positividad en las muestras de leche cruda.

La anterior ausencia de resultados positivos en Costa Rica, podría deberse a la baja incidencia de esta bacteria en el ambiente y a la dificultad que supone su aislamiento, a ello se suma el hecho de que su prevalencia e incidencia son variables (15).

Los cárnicos han sido descritos como el principal vehículo de transmisión de esta bacteria a los seres humanos (16). La mayoría de los brotes alimentarios han sido asociados al consumo de productos derivados del ganado vacuno, especialmente carne molida y leche cruda, por lo cual no es sorprendente encontrar muestras positivas en el presente estudio. En este contexto, la carne vacuna representa el alimento que ocupa el primer lugar donde se ha aislado esta bacteria, lo que se refleja en las estadísticas de prevalencia en carne de vaca molida/deshuesada, siendo de 5% a 18% en Canadá. La explicación de este hecho se atribuye a las operaciones de molido con equipo contaminado y a un procesamiento inadecuado en la remoción de cuero y del tracto gastrointestinal, principal reservorio de dicha bacteria (3).

La presencia de esta bacteria en leche cruda representa un riesgo potencial para la salud pública ya que podría utilizarse como materia prima para la fabricación de otros lácteos como queso, o incluso consumirse sin tratamiento. Un dato interesante de destacar es que, ambas muestras de

leche positivas provienen de productores independientes y por ordeño manual, lo cual confirma una vez más el hecho de que este tipo de ordeño es más propenso a contaminación que el mecánico.

En cuanto a la carne de pollo, esta representa uno de los muchos alimentos vendidos por minoristas que no han sido relacionados con brotes de esta bacteria, pero que bien pueden ser fuente de algunos casos esporádicos de infección (3). De acuerdo a lo anterior, el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, aconseja el establecimiento de estándares de confiabilidad para el consumo de ésta y otras carnes, así como de los productos derivados de ellas (17).

Las posibilidades de contaminación con agentes patógenos que presenta este cárnico se encuentran relacionadas con el tipo de procesamiento llevado a cabo, así como con el tipo de manipulación dado en la obtención de las vísceras o menudos de pollo, en donde el proceso de evisceración representa la principal fuente de contaminación por la probabilidad de ruptura del intestino del animal, el cual a su vez puede ser reservorio de esta bacteria.

*L. monocytogenes* fue aislada a partir del 3% de las muestras de leche evaluadas. Este porcentaje de aislamiento concuerda con otros resultados reportados en la literatura, donde la prevalencia de la bacteria en leche cruda oscila entre 0% en Italia y Nueva Zelanda y un 5,4% en Canadá, encontrándose una prevalencia mundial del alrededor del 2,2% (7, 18). Una vez más se confirma que la leche cruda es una posible fuente del microorganismo, justificándose la necesidad de un manejo y tratamiento adecuados para este alimento.

La leche cruda es muy utilizada como materia prima para la fabricación de queso, helados y otros productos lácteos. No todos los derivados de la leche se fabrican con leche pasteurizada, como es el caso del queso artesanal, al cual se dedica un 25% de la producción láctea nacional y se realiza con escasa tecnología y sin pasteurización. (18). Por otro lado, es importante destacar que se aisló esta bacteria a partir de muestras destinadas a uso industrial así como de productores independientes.

Con respecto a *Salmonella* spp., estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud (WHO), muestran que la salmonelosis representa una de las enfermedades de transmisión alimentaria más frecuente, tanto en países industrializados como en aquellos en vías de desarrollo (1). Por lo tanto, la determinación de esta bacteria en alimentos forma parte de las normas internacionales para la aceptación microbiológica de muchos productos.

En el presente estudio, y contrastando con estudios recientes hechos en canales de procesamiento de las principales industrias avícolas (12), donde no se demuestra una incidencia significativa de esta bacteria, se encontró una prevalencia de un 15% en menudos de pollo adquiridos en

el área metropolitana. Esto refleja una dudosa calidad en el manejo de estos productos posterior a su procesamiento. Ello representa un aumento en la probabilidad de contaminación con serotipos patógenos, llevando inclusive a probables infecciones alimentarias.

Las bacterias aisladas fueron identificadas como *Salmonella* spp. y no en especies particulares. La NAS (National Academy of Sciences) y NRC (National Research Council) consideran que todos los serotipos de esta bacteria presentan igual nivel de importancia al ser identificados en muestras alimentarias, y la determinación a nivel de especies sólo aplica en casos de investigaciones específicas.

Un aspecto importante a considerar con el hallazgo significativo de esta bacteria en pollo, es la potencial presencia de cepas resistentes a antibióticos y su efecto en salud pública, tal y como fue demostrado por Murray (2), donde se evidenció la presencia de *Salmonella* spp. resistente a estreptomycinas, sulfonamidas y especialmente tetraciclinas en granjas avícolas inglesas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la presencia de bacterias patógenas en alimentos de origen animal en Costa Rica, por lo que es importante recalcar la trascendencia del tratamiento térmico en este tipo de productos, así como la necesidad de aplicar el sistema HACCP y la introducción de las Buenas Prácticas de Manufactura dentro de la industria alimentaria, tanto avícola como lechera, como medida para la reducción del riesgo potencial para la salud pública que presentan los patógenos estudiados.

#### AGRADECIMIENTO

Este trabajo recibió apoyo de la Vicerrectoría de Investigación, Universidad de Costa Rica, proyecto 430-99-214.

#### REFERENCIAS

- World Health Organization. Foodborne diseases- possibly 350 times more frequent than reported. World Health Organization, Geneva, 1997.
- Doyle M. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Int J Food Microb.* 1999;12:299-302.
- Samedpour M JE, Liston J. Occurrence of Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in retail fresh sea food, beef, lamb, pork and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:1038-40.
- Arias ML, Monge R, Chaves C, Antillón F. Effect of storage temperatures on growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated in foods from a neotropical environment. *Rev Biol Trop.* 2001;49(2): 517-524.
- Fischetti V, R Novick, J Ferretti, D Portnoy & J Rood. Gram positive pathogens. ASM Press. Washington D C. 2000;473-477.
- Monge R, D Utzinger & ML Ariss. Incidence of *Listeria monocytogenes* in pasteurized ice cream and soft cheese in Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 1994;42(1/2): 327-328.
- Arias ML, R Monge, F Antillón & E Glenn. Occurrence of the bacteria *Listeria* spp. in raw milk in Costa Rica. *Rev Biol Trop.* 1994;42(3): 711-713.
- Arias ML, R Monge, F Antillón & C Chaves. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in meat, poultry and vegetables mixed with different concentrations of mayonnaise. *Rev Biol Trop.* 2001;49(3).
- Mora JR. Use of probes specific for IS 200 to identify *Salmonella*. Tesis. University of California, 1996.
- Baumler A & B Hargis. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. *Science* 2000;287 (5450):50-55.
- Groisman E. Principles of Bacterial Pathogenesis. Academic Press, USA. 266-270, 2001.
- Romero V. Incidencia de *Salmonella* spp. y calidad sanitaria de los canales de pollo procesados en plantas nacionales. Tesis de Licenciatura. Universidad de Costa Rica, 2000.
- Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual. 8<sup>th</sup> Ed. AOAC, USA, 1995.
- Doyle M. *Escherichia coli* O157:H7 and its significance in foods. *Inter J Food Microbiol.* 1991;67 (1-2):1-17, 1991.
- Reuben A, H Treminio, ML Aris & L Villalobos. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from Costa Rican foods. *Rev Biomed.* In press
- Paton J & A Paton. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:450-479.
- Ruscisa MG, Sobol RA. *Escherichia coli* enterohemorrágica. *La Alimentación Latinoamericana.* 1995;208:35-40.
- Oreamuno S. Presencia de *Listeria monocytogenes* y su relación con el nivel de coliformes fecales durante la manufactura de queso blanco en plantas de la zona de Santa Cruz, Turrialba. Tesis. Escuela de Tecnología de Alimentos, Universidad de Costa Rica, 1994.

Recibido: 27-02-2003

Aceptado: 05-11-2003