

**GÉNERO *LISTERIA* EN PRODUCTOS CÁRNICOS:
MÉTODOS MOLECULARES PARA SU DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN**

Lell M, Epifane E, Cañete VA, Cuesta AI, Malis JE

INTI Carnes

acuesta@inti.gob.ar

INTRODUCCIÓN

El género *Listeria* agrupa microorganismos cuyas características son bacilos Gram positivos, no esporulados, aerobios-anaerobios facultativos. Numerosas especies pertenecen al género *Listeria*: *Listeria innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* y *L. monocytogenes*; sólo esta última es patógena para el hombre.

Listeria monocytogenes es una bacteria ampliamente difundida en la naturaleza. Su presencia en los alimentos está determinada por su extensa distribución en el ambiente - tierra, aguas servidas, materia fecal, vegetación, ensilados y entorno de la producción de alimentos - lo que confiere una importante oportunidad para contaminarlos.

El control y detección de este microorganismo patógeno forma parte de sistemas de calidad como el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC o HACCP) y monitoreo de inocuidad por SENASA.

OBJETIVO

Evaluar las características de métodos moleculares aplicados en la confirmación de aislamientos sospechosos de género *Listeria* y/o *Listeria monocytogenes* provenientes de muestras de salazones crudas y cocidas.

DESCRIPCIÓN

El laboratorio de microbiología de INTI-Carnes está trabajando en la implementación de metodologías para detección de patógenos en productos cárnicos, en particular se están validando métodos para detección e identificación de patógenos según metodologías ISO y USDA. (Figura 1 y 2)

Con la finalidad de evaluar métodos moleculares para identificar *Listeria monocytogenes* y género *Listeria*, se realizaron en paralelo el método de USDA (referencia 3) y métodos moleculares (referencia 1 y 2) para identificación de género y especie para muestras de salazones crudas y cocidas.

Los aislamientos obtenidos a partir de matrices cárnicas provenientes de 49 muestras de

salazones crudas y cocidas se han evaluado mediante la identificación de genes empleando cebadores prs F /prs R para género *Listeria* (1) y cebadores Lip1 F1/ Lip2 R1 para *Listeria monocytogenes* (Jofré et al.2005 referencia (2). (Tabla 1)

En todos los casos, se realizaron controles empleando material de referencia microbiológico: *Listeria monocytogenes* ATCC 19114, *Listeria ivanovii* ATCC 19119 y *Listeria innocua* ATCC 33090.

Tabla 1: Cebadores y amplicones específicos de género *Listeria* y *Listeria monocytogenes*.

Gen target	Secuencia de cebadores (5'-3')	Amplicon (pb)	Especificidad	ref
prs F	GCTGAAGA GATTGCCA AAGAAG	370	Género <i>Listeria</i>	1
prs R	CAAAGAAA CCTTGGAT TTGCGG		Género <i>Listeria</i>	1
Lip1 F1	GATACAGA AACATCGG TTGGC	406	<i>Listeria monocytogenes</i>	2
Lip2R1	GTGTAACT TGATGCCA TCAGG		<i>Listeria monocytogenes</i>	2



Figura 1: Laboratorio INTI-Carnes.



Figura 2: Salazones crudas.

RESULTADOS

Los productos de la amplificación se revelaron mediante Electroforesis en gel de agarosa (Figura 3).

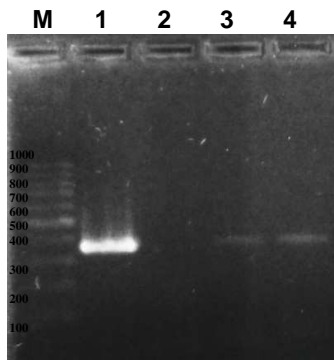


Figura 3: Electroforesis en gel de agarosa conteniendo amplicones de 370-bp correspondiente al gen *prs*. Calle M: Marcador de peso molecular (100bp Marker); Calle 1: *Listeria innocua* ATCC 33090; Calle 2: control de reactivos; Calle 3: aislamiento *Listeria innocua*; Calle 4: aislamiento *Listeria innocua*.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 2. En todos los casos para *Listeria innocua* se detectó el gen *prs* y no se detectó el gen *Lip*.

Tabla 2: Resultados obtenidos para los aislamientos que presentaron ennegrecimiento del Fraser y Mox mediante método de referencia (USDA) y metodologías moleculares.

Aislamientos	Cantidad evaluados	Resultados positivos Método (1)	Resultados positivos Método (2)	Resultados positivos USDA (3)
<i>Listeria monocytogenes</i>	0	-	-	-
<i>Listeria ivanovii</i>	0	-	-	-
<i>Listeria innocua</i>	7	7	0	0
<i>Listeria welshimeri</i>	0	-	-	-
<i>Listeria seeligeri</i>	0	-	-	-
géneros <i>Bacillus</i> / <i>Clostridium</i>	2	0	0	0
géneros <i>Enterococcus</i> / <i>Streptococcus</i>	8	0	0	0
<i>Lmonocytogenes</i> ATCC 19114	1	1	1	1
<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119	1	1	0	0
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	1	1	0	0

CONCLUSIONES

Estos resultados preliminares indican que la PCR es especialmente útil en el análisis para investigación de *Listeria monocytogenes* en salazones por su gran sensibilidad y su alta especificidad.

Cobra importancia este método alternativo y complementario de identificación debido a la dificultad de diferenciar aislamientos de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*.

BIBLIOGRAFÍA

(1) Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR Journal of clinical microbiology; 2004 : 3819–3822.

(2) Jofre A, Martina B, Garrigaa M, Hugasa M, Plab M, Rodríguez-L!azarob D, T. Aymerich T Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. Food Microbiology; 2005 (22):109–115.

(3) United States Department of Agriculture (USDA) Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry and Egg Products, and Environmental Samples MLG 8.09; 05/01/2013.