

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN POR MÉTODOS CONVENCIONALES Y PCR DE *Listeria monocytogenes* EN QUESOS BLANCOS FRESCOS COMERCIALIZADOS EN CUMANÁ, VENEZUELA.

Isolation and Identification by Conventional and PCR Methods of *Listeria monocytogenes* in Fresh White Cheeses Commercialized in Cumaná, Venezuela.

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

Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre, Postgrado en Biología Aplicada
Cerro El Medio. Casa 13. Cumaná, Venezuela. E-mail: lbvillalobosb@yahoo.com

RESUMEN

El queso artesanal es uno de los alimentos que tiene poca supervisión sanitaria durante su elaboración y comercialización. Como se ha visto involucrado en brotes de ETA en Venezuela, y en otros países está asociado a listeriosis, en el presente trabajo se investigó la presencia de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos que se expenden en comercios públicos y municipales de Cumaná. Se analizaron 60 muestras de quesos frescos determinándose los porcentajes de NaCl y pH. El aislamiento y caracterización bioquímica de las cepas de *Listeria spp* se realizaron según la FDA y API Listeria y molecularmente por PCR. Los valores de pH oscilaron entre 3,81 y 7,10 con un promedio de 5,87, el porcentaje de NaCl osciló entre 0,58 y 7,60, con media 2,20. Diez muestras fueron positivas por pruebas bioquímicas convencionales y API Listeria para el género *Listeria*. En la confirmación por PCR, se identificaron 2 *L. monocytogenes*, 2 positivas para el grupo *L. welshimeri- L. selligeri-L. ivanovii* y 5 cepas identificadas como *L. innocua* y 1 *L. grayi*. Las dos *L. monocytogenes*, fueron positivas para gen de la listeriolisina (*hly*). Los datos aportan evidencia de fallas en la elaboración de los quesos artesanales por la gran dispersión en los valores de NaCl y pH, además con este estudio se confirma que *Listeria monocytogenes* puede encontrarse contaminando alimentos de alto consumo en el país.

Palabras clave: Queso, *Listeria monocytogenes*, PCR.

ABSTRACT

The artisan venezuelan cheese is a food that does not have sanitary supervision during its elaboration and sale. This food has been associated with outbreaks of infections diseases in Venezuela and especially listeriosis in North America and Europe, thereby, it was investigated the presence of *Listeria monocytogenes* in this kind of cheese that is commercialized in municipal and public markets of Cumaná. Sixty samples of fresh white cheese were analyzed to determine its NaCl content and pH values. The isolation and biochemical characterization were carried out by FDA standards and API Listeria, and the molecular identification by PCR. The pH values were in the range 3.81-7.10, mean 5.87. The NaCl percentages were in the range, 0.58-7.60 mean 2.20. Ten samples of cheese were positive for *Listeria spp* by biochemical test and API Listeria. PCR confirmation were identified 2 *Listeria monocytogenes*, 2 *L. welshimeri- L. selligeri- L. ivanovii* group, 5 *L. innocua* and one *L. grayi*. The *L. monocytogenes* strains were positive for listeriolisin gene (*hly*). These results show evidence of failures in the elaboration of this artisan cheese due to great dispersion of NaCl and pH values, and confirm the presence *Listeria monocytogenes* in this kind of food.

Key words: Cheese, *Listeria monocytogenes*, PCR.

INTRODUCCIÓN

Listeria monocytogenes es un microorganismo que no era considerado como un importante patógeno transmitido a través de los alimentos hasta hace relativamente poco tiempo, y en consecuencia, no había recibido atención por parte de la

industria alimentaria. Los índices de listeriosis se habían visto ensombrecidos por otros patógenos más evidentes, como son *Salmonella* y *Campylobacter*, sin embargo, los brotes de listeriosis vehiculizados por alimentos al principio de la década de los 80, demostraron la grave naturaleza de la enfermedad, que excepcionalmente cursaba altos índices de mortalidad, en particular en la población más susceptible como son los niños natos, los ancianos y los inmunodeprimidos [17, 23, 40].

La incidencia de listeriosis en humanos es muy baja, normalmente alrededor 2 a 8 casos esporádicos anuales por un millón de habitantes, en Europa y los Estados Unidos [22, 29,30]. Una proporción significativa de la población, estimada en un 3%-10%, hospeda *Listeria* en su tracto gastrointestinal sin mostrar signos de enfermedad [36]. *Listeria monocytogenes* ocasionalmente causa brotes con síntomas usualmente asociados con enfermedades transmitidas por alimentos, tales como náuseas y diarreas [38]. *Listeria* está en la tierra, aguas servidas (desagües de fábricas), materia fecal, vegetación, ensilados y entorno de la producción de alimentos, todo esto está unido a las extraordinarias capacidades fisiológicas de la bacteria. Soporta altas concentraciones de sal (10%-12%), las bajas y altas temperaturas (1°C; 45-50°C), el amplio rango de pH (4,3-9,6) [9,26], y la actividad de agua (aw) mínima para crecer (0,90) [34], son factores que favorecen el desarrollo de este microorganismo en una variedad de alimentos.

La incidencia de *Listeria monocytogenes* en quesos blandos ha sido reportada en España [12], quienes la encontraron en 11,4% del total de muestras de quesos blandos analizados. En el mismo país [40] reportaron para Navarra una ocurrencia del 8,1% en los quesos suaves muestreados. En una planta de productos lácteos en Minas, Brasil, [38], encontraron que el 16,7% de las muestras examinadas contenían *Listeria* spp, sólo 1 de ellas fue *L. monocytogenes*.

En Venezuela en el año 2003, el 45% de los brotes por intoxicaciones alimentarias ocurrieron en escuelas y hogares, de éstos el 33% se originaron por consumo de queso [32] demostrando las deficiencias higiénico-sanitarias en la producción artesanal de este alimento, lo que aunado al alto consumo del producto entre la población de riesgo, conlleva a considerar los quesos blancos frescos como un vehículo potencial para la transmisión de *L. monocytogenes*. Ante esta consideración se desarrolló el presente trabajo para determinar la presencia del patógeno en los quesos blancos que habitualmente se consumen en Cumaná, mediante el uso de métodos convencionales y moleculares.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Se colectaron 60 muestras de 500 g cada una de quesos frescos blancos blandos. Las muestras fueron obtenidas a partir de puntos de ventas del Mercado Municipal, puestos ambulantes y supermercados de la ciudad de Cumaná y se colo-

caron por separado en bolsas plásticas con cierre hermético en cavas con hielo para su traslado al laboratorio de Microbiología. Una vez en el laboratorio, se tomaron alícuotas de 45 y 50g al azar de cada queso para realizar los análisis de pH, sal y bacteriológicos respectivos.

Concentración de sal

Se realizó por el método de Mohr adoptado por la Association of Official Analytical Chemistry (AOAC) [2].

pH

Para medir el grado de intensidad de la acidez, que influye tanto en el sabor, color, textura, así como en la buena apariencia del producto, se trabajó según la norma COVENIN 1315-7 [11].

Aislamiento de *L. monocytogenes* por métodos convencionales y PCR

Cada muestra se analizó por separado siguiendo las indicaciones del Manual Bacteriológico Analítico de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (BAM-FDA) [3] para el aislamiento e identificación convencional de *L. monocytogenes*, además de las pruebas miniaturizadas rápidas API Listeria (BioMerieux, Gambaro).

Reacción en Cadena de la Polimerasa

Para la identificación de las cepas aisladas por la prueba de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se llevó de acuerdo a lo descrito por Bubert y col. [4,31] con la utilización de cuatro pares de iniciadores, que permitieron la confirmación molecular de las cepas aisladas. La extracción del ADN cromosómico se realizó con el kit de extracción y purificación de ADN total Wizard- Promega (Madison, Wisconsin EUA). Como cepa control se utilizó *Listeria monocytogenes* CVCM 446 [10].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Concentraciones de NaCl y valores de pH

Las fluctuaciones en el contenido de sal en las muestras de quesos oscilaron un mínimo de 0,58% y máximo de 7,60% con media de 2,08%. En cuanto al pH, el valor mínimo observado fue de 5,23 y el máximo de 6,86 con una media de 5,97, considerados ligeramente ácidos. En la TABLA I se detalla el grado de acidez y porcentaje de sal observados en las muestras que fueron positivas para la detección del género de *Listeria* spp.

Aislamiento e identificación convencional

Se observaron diferencias en el aislamiento a partir de los medios de Oxford y Palcam, lográndose mayor porcentaje de aislamiento de colonias presuntamente positivas a *Listeria* spp en Agar Oxford, este medio suprimió mejor en este ali-

TABLA I
VALORES DE pH Y PORCENTAJES DE SAL
(BASE HÚMEDA) OBSERVADOS EN MUESTRAS
DE QUESOS BLANCOS FRESCOS COMERCIALIZADOS
EN CUMANÁ, VENEZUELA, POSITIVOS PARA LA
PRESENCIA DE *Listeria monocytogenes* Y OTRAS
ESPECIES DEL GÉNERO/ pH VALUES AND PERCENTAGES
OF SALT (WET BASE) IN WHITE FRESH CHEESES COMMERCIALIZED
IN CUMANA, VENEZUELA, POSITIVES FOR *Listeria monocytogenes*
AND OTHERS *Listeria* SPECIES.

Muestra	pH	NaCl	Género y especie*
Q1.1	7,10	5,85	<i>L. monocytogenes</i>
Q3.3	6,32	4,38	<i>L. seeligeri</i>
Q3.4	3,81	7,60	<i>L. ivanovii</i>
Q4.6	5,50	0,87	<i>L. innocua</i>
Q4.7	5,39	1,28	<i>L. grayi</i>
Q5.8	6,26	0,99	<i>L. innocua</i>
Q6.5	5,99	1,92	<i>L. innocua</i>
Q6.6	5,89	1,88	<i>L. monocytogenes</i>
Q6.7	5,96	1,82	<i>L. innocua</i>
Q6.8	5,88	2,08	<i>L. innocua</i>

* Las cepas fueron aisladas a partir de Agar Selectivo de Oxford.

mento la flora competitiva. De las 60 muestras analizadas 10 (16,6%), fueron positivas para el aislamiento del género *Listeria*. Se aislaron 10 cepas que se confirmaron como miembros del género mediante el empleo de API Listeria, observándose que del total de cepas estudiadas fueron *L. monocytogenes* 2 (20%), *L. innocua* 5 (50%); y 10% para *L. ivanovii*, *L. grayi* y *L. seeligerii*, 1 aislado para cada especie.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para los efectos de los ensayos para PCR, se evaluaron 10 cepas para la identificación específica de *L. monocytogenes*, *L. innocua* y las especies agrupadas (*L. seeligeri*, *L. ivanovii* y *L. welshimerii*). Una primera combinación de iniciadores (monoA y lis1B) derivados de la secuencia del gen *iap*, fue utilizado para la identificación específica de *L. monocytogenes*. La corrida electroforética evidenció que en dos muestras de 10, eran *L. monocytogenes* al dar un producto de PCR de aproximadamente 660 bp (FIG. 1). La segunda combinación de iniciadores (*ino2* y *lis1B*), se empleó para la identificación específica de *L. innocua*. Se observaron productos de 870 bp confirmando la identificación de la especie en las 5 cepas amplificadas (FIG. 2) Las especies agrupadas (*L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimerii*), fueron identificadas usando una tercera combinación de primers (*siw1* y *lis1B*). Mostrando productos de PCR aproximadamente 1.200 bp. Los fragmentos amplificados indicaron que las 2 cepas restantes pertenecen a la especie agrupadas de *Listeria* (*L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimerii*) (FIG. 3). No se observó amplificación del genoma de la cepa identificada bioquímicamente como *L. grayi*.

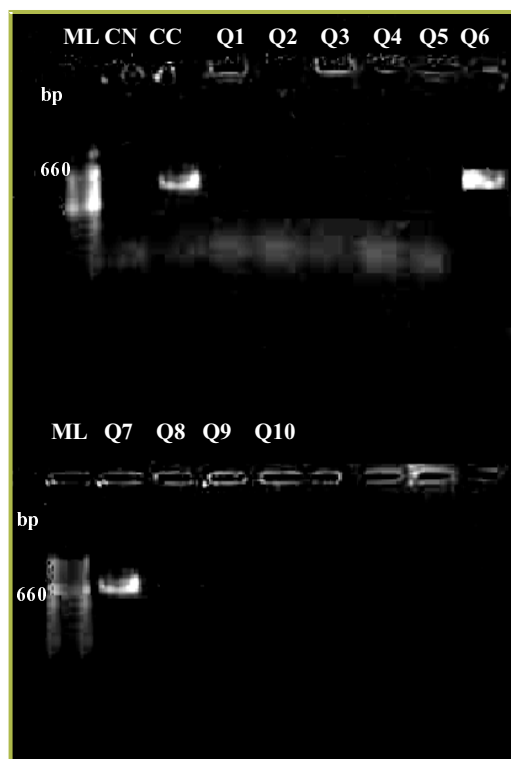


FIGURA 1. CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LOS PRODUCTOS DE PCR ESPECÍFICOS DE *L. monocytogenes*, CON LOS INICIADORES *mono A* Y *lis1B*, AISLADAS DE MUESTRAS DE QUESOS FRESCOS. POZOS: 1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR (ML); 2, CONTROL NEGATIVO (CN); 3, *L. monocytogenes* CERTIFICADA (CC); 4, CEPA 1 (Q1); 5, CEPA 2 (Q2); 6, CEPA 3(Q3); 7, CEPA 4 (Q4) ; 8, CEPA 5 (Q5); 9, CEPA 6 (Q6)*L. monocytogenes*; 10 MARCADOR DE PESO MOLECULAR (ML); 11, CEPA 7 (Q7) *L. monocytogenes*; 12; CEPA 8 (Q8); 13, CEPA 9 (Q9); 14, CEPA 10 (Q10)/ ELECTROPHORETIC PRODUCTS OF PCR, *mono A* AND *lis1B* PRIMERS, IN FRESH SAMPLES OF CHEESE. WELLS 1. LAMBDA MARKER (ML),2 NEGATIVE CONTROL (CN), 3.*L. monocytogenes* CERTIFIED (CC);4, STRAIN 1(Q1); 5 STRAIN 2(Q2); 6 STRAIN 3(Q3); 7 STRAIN 4 (Q4),8, STRAIN 5(Q5); 9,STRAIN 6(Q6) *L. monocytogenes*, 10 LAMBDA MARKER; STRAIN 7 (Q7) *L. monocytogenes*; 12 STRAIN 8 (Q8), 13 STRAIN 9(Q9); 14 STRAIN 10 (Q10).

PCR en la identificación del gen de patogenicidad (*hly*) de *L. Monocytogenes*.

Los productos amplificados mostraron que las cepas identificadas por PCR de *L. Monocytogenes*, contaban con secuencias de ADN del gen de la Listeriolisina (*hly*), al observarse bandas de un tamaño molecular de aproximadamente 730 bp, indicando la presencia de cepas patógenas invasivas (FIG. 4). Estas cepas provenían de muestras de quesos tomadas de supermercados.

En Venezuela la fabricación de quesos comienza en la época colonial y prácticamente en las zonas de ganadería el proceso se ha mantenido inalterable, la experiencia y el conocimiento sobre la fabricación artesanal ha pasado de generación en generación y la tecnificación en gran escala aún no es

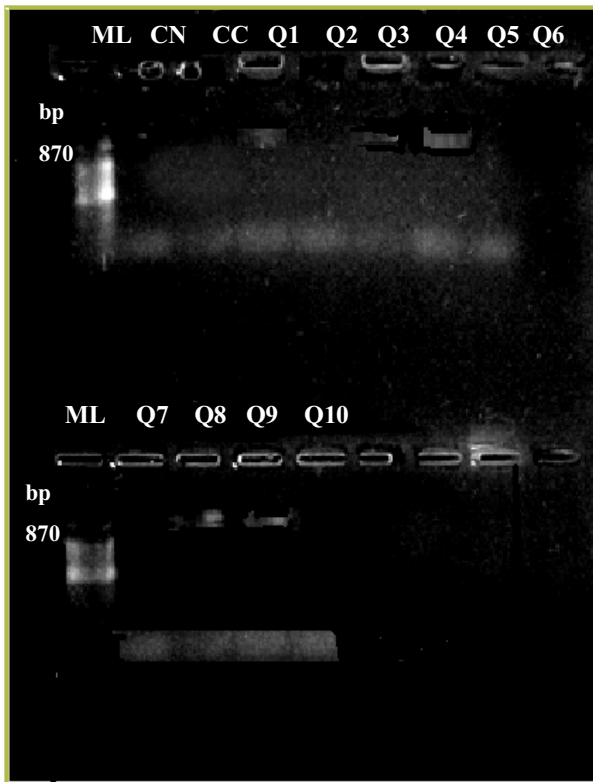


FIGURA 2. CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LOS PRODUCTOS DE PCR ESPECÍFICOS DE *L. INNOCUA* CON LOS INICIADORES *ino2* Y *lis1B*. POZOS: 1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR (ML); 2, CONTROL NEGATIVO (CN); 3, *L. monocytogenes* CERTIFICADA (CC); 4, CEPA 1 (Q1) *L. innocua*; 5, CEPA 2 (Q2); 6, CEPA 3(Q3) *L. innocua*; 7, CEPA 4 (Q4) *L. innocua*; 8, CEPA 5 (Q5); 9, CEPA 6 (Q6); 10 MARCADOR DE PESO MOLECULAR (ML); 11, CEPA 7 (Q7); 12; CEPA 8 (Q8) *L. innocua*; 13, CEPA 9 (Q9) *L. innocua*; 14, CEPA 10 (Q10)/ ELECTROPHORETIC PRODUCTS OF PCR OF *L. innocua*, WITH *ino2* Y *lis1B*, WELLS 1. LAMBDA MARKER (ML), 2 NEGATIVE CONTROL (CN), 3L. *Listeria monocytogenes* CERTIFIED (CC); 4, STRAIN 1(Q1) *L. innocua*; 5 STRAIN 2(Q2); 6 STRAIN 3(Q3) *L. innocua*; 7 STRAIN 4 (Q4) *L. innocua*, 8, STRAIN 5 (Q5); 9, STRAIN 6(Q6). 10 LAMBDA MARKER; STRAIN 7 (Q7) 12 STRAIN 8 (Q8) *L. innocua*, 13. STRAIN 9(Q9) *L. innocua*; 14 STRAIN 10 (Q10).

lo habitual en las zonas productoras con algunas excepciones. Es por ello que las deficientes condiciones higiénicas en la fabricación de estos productos han ocasionado que el queso sea considerado como un sustrato óptimo para el desarrollo de los microorganismos y sus toxinas [1,7,15,16]. En este país, entre los años 1996 y el 2000, las enfermedades transmitidas por alimentos se incrementaron en un 63%, a pesar del subregistro que se lleva. En el 2004, para la semana epidemiológica 43 se habían reportado 18.169 intoxicaciones alimentarias con 1 muerte [32]. Los productos lácteos, en especial los quesos, han sido los alimentos más involucrados seguido de los pescados y mariscos.

Uno de los problemas en la producción artesanal de quesos es que no existe uniformidad en cuanto a los conteni-

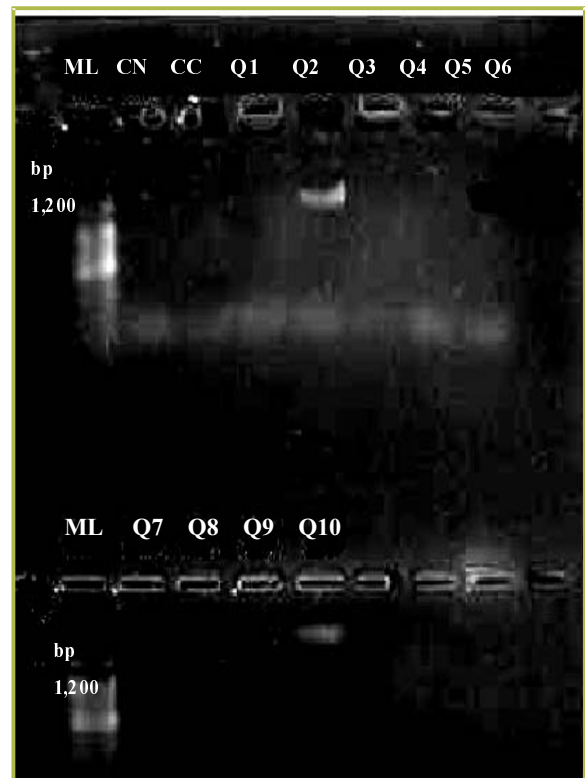


FIGURA 3. CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LOS PRODUCTOS DE PCR ESPECÍFICOS DE LAS ESPECIES AGRUPADAS (*L. welshemerii* - *L. seeligerii* - *L. ivanovii*), CON LOS PRIMERS *siwi1* Y *lis1 B* POZOS: 1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR (ML); 2, CONTROL NEGATIVO (CN); 3, *L. monocytogenes* CERTIFICADA (CC); 4, CEPA 1 (Q1); 5, CEPA 2 (Q2) *L. seeligerii*; 6, CEPA 3 (Q3); 7. CEPA 4 (Q4); 8, CEPA 5 (Q5); 9, CEPA 6 (Q6); 10 MARCADOR DE PESO MOLECULAR (ML); 11, CEPA 7 (Q7); 12; CEPA 8 (Q8); 13, CEPA 9 (Q9); 14, CEPA 10 (Q10) *L. ivanovii*./ ELECTROPHORETIC PRODUCTS OF PCR OF *L. welshemerii*-*L. seeligerii*-*L. ivanovii*) PRIMERS SIWI 1 Y LIS1B. WELLS 1. LAMBDA MARKER (ML), 2 NEGATIVE CONTROL (CN), 3L. *Listeria monocytogenes* CERTIFIED (CC); 4, STRAIN 1(Q1); 5 STRAIN 2(Q2) *L. seeligerii*; 6 STRAIN 3(Q3); 7 STRAIN 4 (Q4), 8 STRAIN 5(Q5); 9, STRAIN 6(Q6) 10 LAMBDA MARKER; STRAIN 7 (Q7) 12 STRAIN 8 (Q8) *L. innocua*, 13 STRAIN 9(Q9); 14 STRAIN 10(Q10) *L. ivanaovii*.

dos de sal, pH, grado de acidez, calidad de la materia prima, sistemas de conservación y transporte, por lo que es impredecible si pueden tener condiciones para sustentar el desarrollo microbiano.

Los límites de crecimiento para *Listeria monocytogenes* se han establecido para un rango temperatura entre 2,5°C – 44°C, pH 4,5-9,5, y cloruro de sodio de 2%, aunque puede crecer en concentraciones de 10% de sal y sobrevivir por cinco días a concentraciones de 20 a 30% de NaCl a temperatura de 4°C [18]. Los aislamientos de las distintas especies de *Listeria* en este trabajo, no mostraron una afinidad en especial para alguna concentración de sal o pH ya que se observaron aislamientos, tanto a concentraciones de 0,99% como a 7,60% de sal y pH entre 3,81 a 7,10. *L. monocytogenes* es capaz de de-

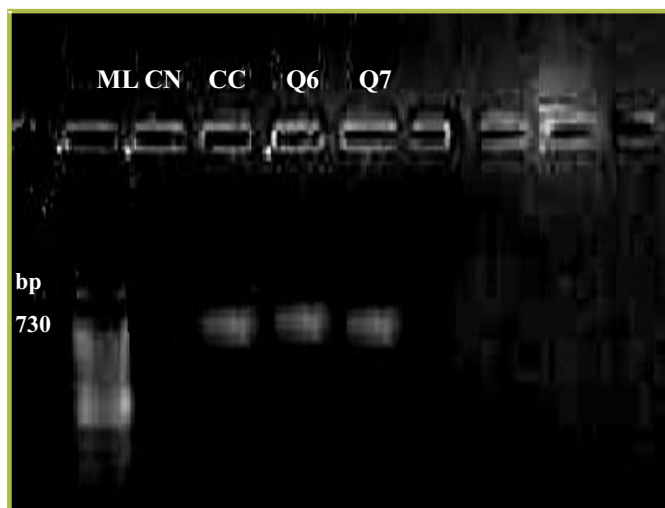


FIGURA 4. CORRIDA ELECTROFORÉTICA DE LOS PRODUCTOS DE PCR ESPECÍFICOS DEL GEN DE PATOGENICIDAD (*hly*) DE *L.monocytogenes*, CON LOS INICIADORES *hlyA* Y *hlyB*. POZOS: 1, MARCADOR DE PESO MOLECULAR (ML); 2, CONTROL NEGATIVO (CN); 3, *L. monocytogenes* CERTIFICADA (CC); 4, CEPA 6 (Q6) *L. monocytogenes*, (*hly*); 5, CEPA 7(Q7) *L. monocytogenes* (*hly*)/ ELECTROPHORETIC PRODUCTS OF PCR SPECIFIC FOR PATHOGENICITY GEN *HLI* OF *L. monocytogenes* WITH *hlyA* Y *hlyB* PRIMERS, WELLS: 1 LAMBDA MARKER (ML); 2, NEGATIVE CONTROL (CN); 3, CERTIFIED *L. monocytogenes* STRAIN (CC); 4 STRAIN 6 (Q6) *L. monocytogenes* (*hly*); 5, STRAIN 7 (Q7) *L. monocytogenes* (*hly*).

sarrollarse en presencia de 10% e incluso del 12% de sal a pesar de su preferencia por una actividad de agua de 0,97, valor que puede estar presente en aquellos productos con mínimo contenido de sal [26]. Al comparar estos datos con los reportados en el presente trabajo, se puede inferir que, el porcentaje promedio de sal se ubicó dentro de los rangos óptimos para el crecimiento y supervivencia de *L. monocytogenes*, puesto que brindó una disponibilidad de agua suficiente para su crecimiento. Se ha reportado que la concentración de sal óptima para que crezca *Listeria spp* a temperaturas inferiores de 10°C, es de 2-2,5% [9].

En cuanto al pH se ha establecido que *Listeria spp.* puede soportar condiciones ácidas mínimas de 4,5, se ha demostrado el incremento en la supervivencia de cepas de *Listeria monocytogenes* adaptadas a condiciones ácidas, especialmente en alimentos que contienen ácido láctico (pH 4,71), ácido cítrico (pH 3,65) o ácido acético (pH 3,0), lo que explicaría la tolerancia a la baja acidez en el proceso de maduración de quesos duros [14, 37]. Resultados similares en el presente estudio fueron reportados en quesos blancos en Turquía [21] y en quesos portugueses [22]. Según lo referido, se puede establecer que el pH junto con la concentración de sal y la temperatura de refrigeración, guardan una estrecha relación con la supervivencia de *L. monocytogenes* en los quesos estudiados, denotando que la mayoría de las muestras analizadas se ex-

pendían a temperatura ambiente que favorece el crecimiento de la bacteria.

Los resultados experimentales mostraron una mayor sensibilidad del medio de Oxford para el aislamiento de *Listeria spp.* en muestras de queso fresco. El medio de Palcam no fue eficaz al permitir el crecimiento de cepas competitivas como *Staphylococcus* y *Streptococcus*, que por las condiciones de elaboración de estos productos son miembros constantes de la flora autóctona, opacando a los microorganismos listéricos que pudiesen estar presentes. La sensibilidad de detección observada por el método BAM-FDA, ha estado cercano al 90%. Basado en estos resultados, muchos de los laboratorios de las industrias alimentarias, utilizan con más frecuencia estos protocolos [19,24], indicando mayor eficiencia de los medios Palcam y Oxford para la recuperación de *L. monocytogenes* en alimentos, aunque su grado de recuperación varíe en función del tipo de alimento. Otros autores han utilizado el Agar Oxford para el aislamiento de *Listeria* a partir de leche y de productos lácteos [13]. Lo que concuerda con los resultados observados, los cuales la totalidad de las cepas aisladas provinieron de medio de Oxford. Recientemente, otros autores también advierten sobre la superioridad del medio Oxford sobre Palcam como medio de aislamiento para *Listeria monocytogenes* [20,43].

El resultado de la aplicación de las pruebas miniaturizadas API *Listeria* para la confirmación de las cepas aisladas de los quesos frescos, fue excelente, obteniendo un perfil de aceptabilidad entre el 98 al 99% en la identificación de las 5 especies históricas: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. grayi* y *L. ivanovii*. La utilización de esta prueba redujo el tiempo de identificación bioquímica tradicional de 4 días a 24 horas, una vez realizado el aislamiento [36].

La utilización de la PCR, permitió la confirmación en la identificación de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas por el método convencional. Esto permitió igualmente, al utilizar un segundo par de iniciadores (*ino2* y *lis1B*), la diferenciación de *L. innocua* y *L. monocytogenes*, las cuales comparten el mismo hábitat ecológico, requerimientos fisiológicos y pueden crecer perfectamente en los medios selectivos corrientes para *Listeria*, desarrollando colonias que morfológicamente son indistinguibles. La confirmación de las otras especies agrupadas (*L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi*) se logró con la combinación de los iniciadores *siwi1* y *lis1B* obteniéndose la identificación de los mismos. Estos resultados confirman lo reportado por Bubert y col. [4] quienes utilizaron 5 iniciadores diferentes para detectar y diferenciar especies de *Listeria*, con un único ensayo de PCR múltiple; los resultados indicaron la superioridad de la técnica sobre los métodos convencionales. Los resultados del presente trabajo con PCR concordaron con la identificación convencional, demostrando que el uso de los métodos convencionales y las técnicas moleculares para esta bacteria son altamente sensibles en la detección e identificación de *Listeria spp* y *Listeria monocytogenes*. La utilización de pruebas confirmatorias por métodos moleculares podría emplearse si se requiere alguna in-

formación genética de los aislados. En esta comparación, se ha referido que la principal ventaja entre un método y otro, en el PCR es la accesibilidad de los resultados, fácilmente detectable en 4 horas seguido del proceso de incubación, mientras que el cultivo convencional, requiere un mínimo de 8 días para el diagnóstico definitivo de *Listeria spp.* [5, 12, 25, 27, 39].

La ocurrencia de *Listeria spp.* en el presente trabajo fue de 16,66%, el cual está por encima de los valores reportados en quesos frescos en Paraná, Brasil [33] donde se reportó que el 6,89% de las muestras analizadas fueron positivas para *Listeria spp.*, al igual que en un estudio en alimentos en Chile [13], donde se observó un 0,8% de positividad para *Listeria spp.* en los quesos analizados; por el contrario, en quesos industrializados de humedad media en Río Grande del Sur en Brasil encontraron el 11% de las muestras positivas para *Listeria spp.* y de éstas el 8% fueron positivas para *L. monocytogenes*, [8]. En España se encontró que el 11,4% de las muestras de quesos suaves analizados contenían *L. monocytogenes* [41]. Valores similares se observaron en quesos frescos comercializados en Perú [42], donde reportaron que el 17,30% de las muestras estaban contaminadas por *Listeria spp.* y de éstas, el 38,8% fueron confirmadas como *L. monocytogenes*. Recientemente, en un estudio realizado en plantas productoras de queso blanco fresco al estilo latino en Estados Unidos, *L. monocytogenes* se detectó en el 6,3% de los quesos analizados [28]. En Venezuela, un trabajo presentado por Carrillo y Zambrano [6] en quesos blancos en el estado Táchira reportó un 9,5% de aislamientos para el género *Listeria spp.*, por el método TECRA® UNIQUE™ LISTERIA, pero no se logró identificar ninguna cepa como perteneciente a la especie *L. monocytogenes*.

El nivel de *L. monocytogenes* tolerado en los países es muy variable, va de cero en 25 gramos en Estados Unidos, hasta permitir la presencia de 100 UFC/g en algunos países de la Unión Europea. Los expertos internacionales que participaron en la reunión informal de trabajo de la Organización Mundial de la Salud sobre Listeriosis, llegaron a la conclusión de que no es posible la eliminación total de *L. monocytogenes* de todos los alimentos, más bien, el punto crítico no es cómo prevenir la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos, sino cómo controlarla para minimizar sus niveles en los mismos [35]. En Venezuela no hay reglamentación al respecto, pero en este trabajo se demuestra que *L. monocytogenes* se encuentra en estos alimentos y es necesario seguir algunas de las legislaciones vigentes, sobre todo en alimentos que deseen participar en el comercio internacional.

CONCLUSIONES

Las muestras de quesos analizadas mostraron gran variabilidad en cuanto a su contenido de sal y pH, indicando que no hay uniformidad en el proceso de producción quesera artesanal del país.

El 16,6% de las muestras analizadas fueron positivas para la presencia del género *Listeria*.

Listeria monocytogenes se encontró contaminando un producto de alto consumo nacional.

Las cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas se revelaron como virulentas por medio de la técnica de la reacción en Cadena de la Polimerasa.

La identificación convencional por medio del sistema API *Listeria*, fue comparable al PCR para la identificación del género y especie.

La técnica del PCR, es útil cuando se requiere diferenciar *L. innocua* de *L. monocytogenes* y verificar la virulencia de la cepa.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ALVAREZ, V.D.; VILLALOBOS DE B., L.B.; REYNALES, E. Calidad sanitaria del queso llanero elaborado en fincas del municipio Zaraza, Guarico, Venezuela. **Acta Cient. Venzla.** 52 Suplemento 3. 175 pp. 2001.
- [2] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (A.O.A.C). 13 th ed. Washington. D. C. 320 pp. 1980.
- [3] FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in food Chapter 10. 8th Ed. 31 pp. 1992.
- [4] BUBERT, A.; HEIN, I.; RAUCH, M.; LEHNER, A.; YOON, B.; GOEBEL, W.; WAGNER, M. Detection and differentiation of *Listeria spp.* by a single reaction based on multiplex PCR. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (10): 4688-4692.1999.
- [5] CARCAMO, P.; FIGUEROA, G. Empleo de un ensayo de PCR para confirmar la presencia de *Listeria monocytogenes* en alimentos. Laboratorio de Microbiología. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Santiago de Chile. En Línea: www.inta.cl/organizacion/area/ciencia-al.../2000.31.03.2005.
- [6] CARRILLO, L.; ZAMBRANO, M. Detección de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos semiduros comercializados en la ciudad de San Cristóbal-Estado Táchira. **Acta Cientif. Venzla.** 52 Suplemento 3. 174-175 pp. 2001.
- [7] CASTILLO, C.; SOSA, M.A.; CAÑIZALES, L.M.; GUEDEZ, C.; ABREU, A.; ARAUJO, M.; DE LA CRUZ, O.; VIERA, J.; CABRERA, N.; CONTRERAS, J. Determinación de la calidad microbiológica en quesos pasteurizados del estado Trujillo-Venezuela. **VIII Congreso Venezolano de Microbiología.** 50 años de la SVM. 1-14 de Noviembre. Caracas, Venezuela. En Línea: <http://congresomicrobiologia.ucv.ve.2004.23-11-2004>.
- [8] CAVALET, D.M.; FACCIN, C.; DE SIQUEIRA, C.. Incidencia de *Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes* em

- quietos de media umida de industrializados no estado do Rio Grande do Sul-Brasil. **VII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los alimentos**. Santiago de Chile. 10 – 14 Noviembre. j-14. 2002.
- [9] COLE, M.; JONES, M.; HOLYOAK, C. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. **J. Appl. Bacteriol.** 69: 63-72.1990.
- [10] CENTRO VENEZOLANO DE COLECCIONES DE MICROORGANISMOS (CVCM). Instituto de Biología Experimental Universidad Central de Venezuela. 51 pp. 2005.
- [11] COVENIN. Comisión Venezolana de Normas industriales. "Alimentos - determinación de pH (Acidez iónica)". (1315-79). 6pp. 1979.
- [12] COPES, J.; PELLICER, K.; ECHEVERRÍA, H.G.; STANCHI, N.O.; MARTÍNEZ, C.; LEARDINI, N. Investigation of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. **Rev. Arg. Microbiol.** 63(3):275-280. 2000.
- [13] CORDANO, A.M.; ROCOURT, J. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Chile. **Intl. J. Food Microbiol.** 70(1-2):175- 178. 2001.
- [14] CORMAC, G.M.; GAHAN, H.; O'DRISCOLL, B.; HILL, C. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** 62 (9):3128 -3132. 1996.
- [15] CURTIS, M.L.; FRANCHESCHI, O.; CASTRO, N. de *Listeria monocytogenes* en vegetales minimamente procesados. **Arch. Latinoam. Nutr.** 52(3):282-288. 2002.
- [16] DÍAZ-RIVERO, C.; GONZÁLEZ DE G., B. *Staphylococcus aureus* en queso blanco fresco y su relación con diferentes microorganismos indicadores de calidad sanitaria. Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición. Universidad Autónoma de Nueva León, Monterrey, México. **RESPYN** 2 (3) julio-septiembre 2001. En Línea: www.uanl.mx/publicaciones/respyn/i/3/articulos/s.aureus.1.htm. 01-12-2005.
- [17] DOYLE, M. Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. Food Research Institute. **FRI Briefings** 13 pp. 2001.
- [18] DOYLE, M. Effect of environmental and processing conditions on *Listeria monocytogenes*. **Food Tech.** 42(4):169-171. 1988.
- [19] DOYLE, M.; SCHOENI, J. Comparison of procedures for isolating *Listeria monocytogenes* in soft, surface- ripened cheese. **J. Food.Prot.**50: 4-6. 1987.
- [20] EL MARRAKCHI, A.; BAU'HANDI, N.; HAMAN, N. Performance of a new chromogenic plating medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from marine environments. **Letts. Appl. Microbiol.** 40(2):87-91. 2005.
- [21] ERKMEN, O. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of Turkish white cheese. **Nahrung** 45(1):55-58. 2001.
- [22] FALEIRO, M.L.; ANDREW, P.W.; POWER, D. Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods. **Int. J. Food Microbiol.** 84(2):207-216. 2003.
- [23] FARBER, J.; PETERKIN, P. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiol. Rev.** 55: 476-511. 1991.
- [24] HAYES, P.; GRAVES, L.; SWAMINATHAN, B.; AJILLO, G.; MALCOLM, G.; WEAVER, R.; RANSON, R.; DEEVER, K; PLIKAYTIS, .B; SCHUCHAT, A.; WENGER, J.; PINNER, R.; BROOME, C. Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods. **J. Food. Prot.** 55: 952-959. 1992.
- [25] HOLKO, I.; URBANOVÁ, J.; KANTIKOVÁ, M.; PÁSTOROVÁ, K.; KMET, V. PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products and differentiation of suspect Isolates. **Acta Vet. Brno.** 71: 125-131. 2002.
- [26] HOLT, J.; NOEL, R.K.; PETER, H.A.; SMCATH, J.; STALEY, T.; STANLEY, T. In: **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Genus *Listeria* 9th Ed. Williams & Wilkins, Baltimore. Maryland. U.S.A. 566-582 pp. 1994.
- [27] IÑIGUEZ-PALOMARES, P.; DÍAZ, M.; ACEDO, F.; GONZÁLEZ, H. Detección y prevalencia de *Listeria monocytogenes* en queso fresco por reacción en cadena de la polimerasa y método oficial. Laboratorio de Microbiología de la Coordinación de Ciencias de los Alimentos, Centro de Investigaciones en Alimentación y Desarrollo. Hermosillo, México. Trabajo de Grado. 83 pp. 2000.
- [28] KABUKI, D.Y.; KUANYE, A.Y.; WIEDMAN, M.; BOORK, J. Molecular subtyping and tracking of *Listeria monocytogenes* in Latin-style fresh cheese processing plants. **J. Dairy Sci.** 87(9):2803-2812. 2004.
- [29] KELA, E.; HOLMSTROM, P. Infectious diseases in Finland 200. Publications of the National Public Health Institute. **KTLB.** 27pp. 2001.
- [30] LUKINMAA, S.; MIETTINEN, M.; NAKARI, U.M.; KORKIALA, L.; SIITONEN, A. *Listeria monocytogenes* isolates from invasive infections; variation of sero and genotypes during 21 years period in Finland. **J. Clin. Microbiol.** 41:1694-1700. 2003.
- [31] MARTÍNEZ N., R.E.; VILLALOBOS DE B., L.B. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en Atún fresco expedito en la ciudad de Cumaná, Venezuela. **Rev. Cientif. FCV-LUZ.** XIV (4):354-357. 2004.
- [32] MINISTERIO DE SALUD Y DESARROLLO SOCIAL. Gobierno Bolivariano de Venezuela. Sección de Información Social y Estadística. Anuario 2004. 235 pp. 2005.

- [33] MOSCALEWSKI, W.S.; LEONE, M.A.; PONTARALO, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em queijos comercializados no estado de Paraná, Brasil, no ano de 2001. **VII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los alimentos**. Santiago de Chile. 10 – 14 Noviembre. Chile. J-18. 2002.
- [34] NOLAN, D.; CHAMBLIN, D.; TROLLER, J. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. **Intl. J. Food. Microbiol.** 16: 323 – 335.1992.
- [35] ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACIÓN. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. Evaluación de riesgos de *L. monocytogenes* en alimentos para el consumo. Serie de Evaluación de Riesgos Microbiológicos 48pp. 2004.
- [36] RIJPENS, N.; HERMAN, L. Comparison of selective and non selective primary enrichments for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. **Intl. J. Food Microbiol.** 94(1):15-22. 2004.
- [37] RYSER, E.; MARTH, E. Behavior of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of brick cheese. **J. Dairy. Sci.** 72: 838-853. 1989.
- [38] SILVA, I.; ALMEIDA, R.C.; ALVES, M.A.; ALMEIDA, P. Occurrence of *Listeria spp.* In critical control point and the environments of Minas Frescal Cheese processing. **Intl. J. Food Microbiol.** 81(3):241-248. 2003.
- [39] SCHLECH, W.F. Foodborne Listeriosis. **Clin. Infect. Dis.** 31: 770-775. 2000.
- [40] TORRES, K.; POUTOU, A.; CARRASCAL, A.K.; SIERRA, S.C.; MERCADO, M. Validación de PCR para la detección de *Listeria monocytogenes* en carne cruda de res y pollo. **MVZ.Córdoba** 9 (2): 414-427. 2004.
- [41] VITAS, A. I.; GARCÍA-JALON, V.A. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in fresh and processed foods in Navarra (Spain). **Intl. J. Fod Microbiol.** 90(3):349-356. 2004.
- [42] VILLANUEVA, E.U. *Listeria monocytogenes* en quesos frescos comercializados en 5 mercados de expendio en Lima. **VII Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de los alimentos**. Santiago de Chile. 10 – 14. Noviembre. Chile. I-07. 2002.
- [43] WARBURTON, D.W.; FARBER, J.M.; ARMSTRONG, A.; CALDEIRA, R.; HUNT, T.; MESSIER, S.; PLANTE, R.; TIWARI, N.P.; VINET, J. A comparative study of the FDA and USDA methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. **Intl. Food Microbiol.** 13 (2): 105-118.1991.