



UNIVERSIDAD DE ORIENTE
NÚCLEO DE SUCRE
ESCUELA DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA

IDENTIFICACIÓN POR CULTIVOS CONVENCIONALES, CROMOGÉNICO Y
PCR DE *Listeria monocytogenes* EN MOLUSCOS BIVALVOS
COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, VENEZUELA
(Modalidad: Investigación)

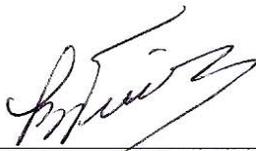
PAOLA JOHANA MÉNDEZ PÉREZ

TRABAJO DE GRADO PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CUMANÁ, 2011

IDENTIFICACIÓN POR CULTIVOS CONVENCIONALES, CROMOGÉNICO Y
PCR DE *Listeria monocytogenes* EN MOLUSCOS BIVALVOS
COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, VENEZUELA

APROBADO POR:



Profa. Luz B. Villalobos

Asesora



Profa. Rosa E. Martínez

Coasesora



Jurado



Jurado

ÍNDICE

AGRADECIMIENTO	i
DEDICATORIA	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE ANEXOS.....	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCIÓN	1
METODOLOGÍA	8
Recolección De Las Muestras.....	8
Determinación De pH	8
Aislamiento Convencional De <i>Listeria sp.</i>	8
Aislamiento En Medio Cromogénico De <i>Listeria monocytogenes</i>	10
Extracción De ADN genómico	11
Ensayos De PCR	12
RESULTADOS.....	15
Valores De pH De Los Moluscos Bivalvos	15
Aislamiento de <i>Listeria sp.</i> y <i>Listeria monocytogenes</i> en moluscos bivalvos.....	16
DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	31
RECOMENDACIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXOS	45
HOJA DE METADATOS	46

AGRADECIMIENTO

Detrás del desarrollo de este trabajo de tesis hubo muchas vivencias, aprendizaje, agradecimientos y sentimientos de felicidad y nostalgias al poder concretar un camino intenso de estudio y poder ver el fruto de éste reflejado más que en un término, en el comienzo de una gran realización personal.

Mi primer agradecimiento y el más importante es para DIOS, por darme la bendición de su amor, por estar siempre conmigo llenándome de fortaleza, voluntad y confianza, gracias por permitirme culminar esta meta padre.

Quiero darle las gracias especialmente a mi madre Rosa Neyda Méndez por su gran amor, su incondicional apoyo y dedicación que han hecho de mí la mujer que soy, a mis abuelos y demás familiares con quienes he vivido siempre, les doy las gracias por su cariño y apoyo ofrecido. A Gilberto Ordaz quien ha compartido conmigo momentos maravillosos, le agradezco por su apoyo, fortaleza y comprensión y por enseñarme lo buena y mejor que puedo ser en esta vida.

Quiero dar mi sincero agradecimiento a mis dos queridas asesoras, la profesora Luz B. Villalobos por permitirme realizar esta investigación, con su apoyo y consejos ofrecidos, y a la profesora Rosa E. Martínez, por sentir la confianza en mí y darme su ayuda incondicional en la realización de este trabajo.

Al Departamento de Biología de la Universidad de Oriente, donde me formé profesionalmente gracias a sus conocimientos impartidos, al Postgrado en Biología Aplicada y Laboratorio de Bacteriología donde realicé todos los análisis pertinentes.

Un especial agradecimiento a la Lcda. Carmen Zárraga excelente profesional y

amiga, y al Lcdo. Gabriel Ordaz mi cuñis querido, quienes siempre estuvieron muy pendientes de mí, me tendieron su mano amiga para ayudarme y apoyarme a lo largo de mis estudios.

A mis compañeras y amigas, Evelin Quilarque y Yosmar Rodríguez, quienes me brindaron su apoyo, consejos y amor de amigas a lo largo de la carrera, a Lourdes Cardozo una amiga incondicional a quien quiero mucho y que Dios me permitió tener la dicha de conocerla finalizando mis materias. Y a todos mis queridos amigos de El Peñón por apoyarme, a quienes aprecio muchísimo con quienes he compartido momentos felices y valiosos de amistad.

A todos muchísimas gracias...

DEDICATORIA

*A DIOS nuestro padre sobre todas las cosas,
porque gracias a Él pude hacer posible la realización de este trabajo,
a mi madre ROSA NEYDA por traerme al mundo, ejemplo de amor,
constancia y sacrificio, a mis abuelos JESÚS y PAULA quienes me han dado
su amor y me enseñaron a seguir adelante con mucha perseverancia y ganas,
a mi amor GILBERTO ORDAZ quien ha estado junto a mi en las buenas y
malas, dándome su inmenso apoyo, consejos y amor y, por último,
pero no menos importante, a todos mis SERES QUERIDOS y AMIGOS
que estuvieron muy pendientes de mi...*

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Secuencia de primers utilizado para identificar la presencia del género <i>Listeria</i>	13
Tabla 2. Secuencias de primers utilizados para la identificación de los serotipos más comunes de <i>L. monocytogenes</i>	13
Tabla 3. Pruebas bioquímicas diferenciales realizadas para la identificación de cepas de <i>Listeria</i> sp. aisladas en pepitonas (P) y ostra (O)	20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Valores promedios del pH de las muestras de moluscos bivalvos comercializados en la ciudad de Cumaná	15
Figura 2. Porcentaje de aislamiento de colonias características del género <i>Listeria</i> en moluscos bivalvos (ostras y pepitonas) comercializados en la ciudad de Cumaná	16
Figura 3. Crecimiento de colonias con características del género <i>Staphylococcus</i> spp. (A) y <i>Lactobacillus</i> spp. (B) en medios convencionales a partir de las muestras de ostras	17
Figura 4. Características morfológicas típicas de las colonias del género <i>Listeria</i> aisladas en medios convencionales: Palcam (A) y Oxford (B) a partir de muestras de pepitonas	17
Las cepas de <i>Listeria</i> aisladas mediante los medios convencionales utilizados mostraron características bioquímicas comunes al género, sin embargo, diferencias en la fermentación de los azúcares (manitol, ramnosa, xilosa) y la prueba de hemólisis en agar sangre de cordero al 5%, permitieron identificar la presencia presuntiva de la especie no patógena <i>L. innocua</i> en muestras de pepitonas e indicando la ausencia presuntiva de la especie patógena <i>L. monocytogenes</i> (tabla 3).	18
Figura 5. Características morfológicas de colonias de <i>Listeria</i> sp. no patógenas en medio cromogénico “Agar <i>Listeria</i> Brilliance”	18
Figura 6. Crecimientos de cepas sospechosas de <i>L. monocytogenes</i> (colonias azul verdosas rodeadas por halo blanco opaco) en el medio cromogénico a partir de muestras de ostras	19
Figura 7. Bacilos largos Gram positivos no comunes de <i>L. monocytogenes</i>	20
Figura 8. Productos de PCR específicos de <i>Listeria</i> sp. con primers prs. Pozos: 1- marcador de peso molecular; 2- control positivo; 3- control negativo; 4 al 9- muestras positivas para <i>Listeria</i> sp.	22
Figura 9. Corrida electroforética para la identificación de los serotipos de <i>Listeria</i>	

monocytogenes con los primers Imo0737, Imo1118, ORF2819 y ORF2110. Pozos: 1 y 23- marcador de peso molecular; 2 al 22- muestras negativas para serotipos de L. monocytogenes con ausencia de productos de amplificación..... 22

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Identificación bioquímica y características diferenciales del género <i>Listeria</i> (Gasanov et al., 2005)	45
Anexo 2. Colonias de <i>L. monocytogenes</i> que crecen en el medio cromogénico denominado BBL CHROMagar <i>Listeria</i> ¶después de 24 h de incubación a 35°C (azul verdosas rodeadas por halos blancos opacos) (Hegde et al., 2007)	45

RESUMEN

Esta investigación tuvo como objetivo principal identificar por cultivos convencionales, cromogénico y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cepas de *Listeria monocytogenes* en muestras de pepitonas y ostras comercializadas en la ciudad de Cumaná, para ello se analizaron 25 muestras de ostras (*Pinctada imbricata*) y 25 de pepitonas (*Arca zebra*). A ambos productos se les determinó el pH como parámetro de frescura según la Comisión Venezolana de Normas Industriales COVENIN (1315-79), se emplearon dos métodos microbiológicos de detección para *L. monocytogenes*, un método convencional según el Manual Analítico Bacteriológico de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), en su edición N° 7 (1992) que involucró el uso de medios convencionales y uno alternativo recomendado por la Organización Internacional de Estandarización (ISO 11290-1:1997), para ello se utilizó un medio de cultivo cromogénico. A las cepas aisladas presuntivamente, se les realizaron ensayos de PCR para detectar cepas de *Listeria* sp. y los serotipos principales de *L. monocytogenes*. Los resultados del parámetro pH mostraron valores promedios de 6,45 para las ostras y 6,50 para las pepitonas, valores permitidos por la norma COVENIN. Se reporta que el 12% (6) del total de las muestras evaluadas fueron positivas para *Listeria* sp., de las cuales 10% (5) fueron muestras de pepitonas y 2% (1) de ostras. Ambos métodos microbiológicos aplicados concordaron con la identificación bioquímica de la especie *L. innocua* como único organismo listérico presente en dichas muestras y demostraron la ausencia de *L. monocytogenes*. La identificación por PCR confirmó la presencia de cepas positivas de *Listeria* sp. y demostró que ninguna de las muestras positivas estaban contaminadas por serotipos de la especie patógena *L. monocytogenes*. La presencia de listerias no patógenas como *L. innocua*, en pepitonas y ostras expandidas en la ciudad indican que el proceso de manipulación de estos alimentos podría propiciar la entrada de cepas patógenas, lo que debe alertar a las autoridades sanitarias a ejercer un mejor control sanitario en cuanto a la manipulación, conservación del producto y de las condiciones higiénicas en los distintos sitios de expendios de los moluscos bivalvos.

INTRODUCCIÓN

El género *Listeria* recibe su nombre en honor al científico británico Lord Joseph Lister, pionero en el concepto de la cirugía aséptica (Bell y Kyriakides, 2000). Inicialmente el género fue incluido dentro de la familia Corynebacteriaceae, sin embargo, en la actualidad está ubicado taxonómicamente en la rama *Clostridium-Lactobacillus-Bacillus*, de la filogenia de las bacterias Gram positivas, la cual también incluye a los estafilococos y estreptococos (Frazier y Westhoff, 1993; Bille *et al.*, 2003; Prescott *et al.*, 2004).

Este género se compone de seis especies estrechamente relacionadas: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* y *L. grayi* (Jones, 1992; Rocourt *et al.*, 1992). Análisis filogenéticos basados en la secuencia de los rDNAs 16S y 23S, han revelado dos líneas de descendencia del género, un grupo relativamente distante, correspondiente a *L. grayi* y otro grupo formado por las especies restantes, que a su vez se divide en dos ramas evolutivas distintas, la primera como *L. monocytogenes* y *L. innocua*, y la segunda abarca *L. ivanovii*, *L. seeligeri* y *L. welshimeri* (Vásquez *et al.*, 2001; Paillard *et al.*, 2003; Torres *et al.*, 2005).

Listeria sp. se caracteriza por ser bacilos Gram positivos cortos que miden entre 0,5-2 µm de largo por 0,2-0,5 µm de grueso, no esporulados ni ramificados, que suelen observarse en disposición individual o formando cadenas cortas. Algunas especies presentan de 1 a 5 flagelos peritricos que les confieren movilidad a 28°C. Todas las especies son positivas a la reacción de la esculina, produciendo en medios convencionales (Oxford y Palcam) un halo negro alrededor de las colonias. Tras 24-48 horas de incubación en medios nutritivos sólidos (agar) las colonias listéricas, son de un tamaño de 1 a 2,5 mm de diámetro, redondas, translúcidas con apariencia de gota de rocío, ligeramente convexas con la superficie fina y el margen entero. En

cultivos viejos, de 3 a 7 días, las colonias son grandes (3 a 5 mm), con una zona central más opaca y con un aspecto áspero y rugoso (Bubert *et al.*, 1997; Trepát, 2002; Rivera *et al.*, 2006).

Bioquímicamente son anaerobias facultativas, catalasa positivas y oxidasa negativas. Las reacciones Voges-Proskauer y rojo de metilo son positivas. No hidrolizan la urea ni la gelatina; no producen indol ni sulfuro de hidrogeno (H₂S), pero si ácido a partir de la D-glucosa. La fermentación de algunos azúcares y la capacidad hemolítica permite diferenciar las especies de *Listeria* (Farber y Peterkin, 1991).

Listeria sp. y en especial *L. monocytogenes* tienen la capacidad de sobrevivir y multiplicarse a bajas y altas temperaturas, aunque su temperatura óptima de crecimiento está entre 30 a 37 °C y a 4-5°C su crecimiento es más lento, además pueden soportar un amplio rango de pH (5,0-9,0), y altas concentraciones de sal (Brooks *et al.*, 1989; Cole *et al.*, 1990; Nolan *et al.*, 1992), hechos que contribuyen a explicar la omnipresencia de estos microorganismos en el medio ambiente.

Todas las especies de *Listeria* han sido aisladas del suelo, aguas residuales, lodos, agua, tierra, ensilados, alimentos como carnes, quesos, vegetales, mariscos, pescados, heces de animales y de personas sanas. También se han encontrado en 37 especies de mamíferos domésticos y salvajes, así como en aves y algunas especies de peces y mariscos (Wiedmann *et al.*, 1997; Joyce *et al.*, 2002; Uhtil *et al.*, 2004).

La especie *L. monocytogenes* es un importante patógeno intracelular de transmisión alimentaria que produce en humanos y animales una infección denominada "Listeriosis". Durante muchos años, se le había considerado sólo patógeno de animales; su papel significativo como patógeno humano transmitido por alimentos se hace evidente a partir de 1980, cuando comienzan a aparecer en la literatura informes documentados de brotes de listeriosis por consumo de alimentos contaminados

(McLauchlin, 1997a; Bell y Kyriakides, 2000). Alimentos como la leche, el queso, la mantequilla, la carne de res, la carne de cerdo, las aves, los vegetales, los productos del mar y particularmente los productos listos para consumo rápido han aparecido como vehículos en brotes esporádicos y epidemias de listeriosis (Kells y Gilmour, 2004). Por lo que, los estándares microbiológicos de la FDA (2001) han establecido un nivel cero tolerancia para *L. monocytogenes* en muestras de alimentos (0 UFC/g de alimento).

Se han identificado 13 serotipos de *L. monocytogenes* basados en los antígenos somático (O) y flagelar (H) (Torres *et al.*, 2005). Según datos epidemiológicos de diversos países, al menos el 95% de las cepas de *L. monocytogenes* aisladas de alimentos y pacientes asociados a brotes son de los serotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c, y 4b; no obstante, todos los serotipos son potencialmente capaces de causar infección en los humanos (Southwick y Purich, 1996; Chasseignaux *et al.*, 2001; Doumith *et al.*, 2004). El serotipo 4b es el responsable de grandes brotes epidémicos informados en el mundo, así como del 90 al 95% de los casos esporádicos (Callejo *et al.*, 2008), pero las cepas de grupo antigénico 1/2 (1/2a, 1/2b y 1/2c) predominan en los aislamientos a partir de alimentos (Rocourt *et al.*, 2000). Sin embargo, los serotipos 3a, 3b, 3c, 4a, 4c, 4e, 4d y 7 son muy infrecuentes en alimentos y rara vez están asociados a infección humana (Callejo *et al.*, 2008).

Las manifestaciones clínicas de la listeriosis ocurren solo cuando la infección se ha diseminado en todo el organismo; en brotes producidos por la ingesta de alimentos contaminados sobrevienen síntomas gripales, gastrointestinales como náuseas, dolor abdominal, diarrea y fiebre, (infección no invasora). Otras manifestaciones son septicemia, meningitis o meningoencefalitis, encefalitis, e infecciones intrauterinas o cervicales en las mujeres embarazadas (infección invasora), que pueden dar lugar al aborto espontáneo en el primer trimestre o provocar la muerte del feto al momento del parto (Ornaque *et al.*, 1997; Ryan *et al.*, 2004).

La listeriosis invasiva es una enfermedad grave asociada principalmente a un grupo específico de personas. Siendo las poblaciones más susceptibles a contraer infecciones una tasa de mortalidad alta son los niños recién nacidos, ancianos, individuos inmunodeprimidos y mujeres embarazadas (Vásquez-Boland *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2006). Mientras que las infecciones no invasivas pueden ocurrir bastante leve en personas sanas (Crum, 2002). Muchos investigadores señalan que de 1.000 personas que se infectan al año una cuarta parte fallece a causa de ésta (Consessotto *et al.*, 1997; Felsdine *et al.*, 1997; Espinoza *et al.*, 2004).

La detección e identificación rápida de *L. monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en muestras de alimentos es a menudo difícil debido a la baja incidencia y al gran número de organismos competidores (Gasarov *et al.*, 2005; Hegde *et al.*, 2007), por lo que se han desarrollado métodos convencionales para su detección, que implican tres protocolos: enriquecimientos selectivos, aislamientos en medios selectivos e identificación y confirmación bioquímica. El éxito de estos protocolos va a depender de: el número y el estado de los microorganismos en la muestra estudiada, la selectividad del medio (un equilibrio entre la inhibición de los competidores y la inhibición del organismo de interés) y las condiciones de incubación (tiempo, temperatura, presencia de oxígeno) (Beumer y Hazeleger, 2003).

Los medios convencionales (Palcam y Oxford) permiten la detección de organismos listéricos sobre la base de la hidrólisis de esculina, mediante la formación de colonias de color verde-grisáceo con halos color marrón-negro alrededor de las colonias, consecuencia de la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S). Los iones férricos que se le añaden al medio de cultivo reaccionan con la esculina y forman esculetina (6,7-dihydroxycoumarin), lo que permite que se detecte la reacción por medio del oscurecimiento del medio y los alrededores de la colonia, independientemente de si éstas son, en efecto de *L. monocytogenes* o de cualquier otra *Listeria* (Reissbrodt, 2004; Hegde *et al.*, 2007).

Aunque estos medios han sido encontrados eficientes para el aislamiento de cepas de *Listeria* a partir de productos alimenticios con células listéricas dañadas y con una rica microflora competitiva, ellos no permiten distinguir entre una colonia característica de *Listeria* y una colonia de *L. monocytogenes* (Scotter *et al.*, 2001).

Ante la necesidad de un medio de aislamiento capaz de diferenciar claramente colonias de *L. monocytogenes* de las otras colonias de *Listeria* y, particularmente de la *L. innocua*, surgen medios de cultivos alternativos denominados cromogénicos, como el medio ALOA (Agar *Listeria* según Ottaviani y Agosti) (Carles *et al.*, 1997; Vlaemynck *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2001). Estos medios de cultivos tienen su principio en que contienen sustratos cromogénicos específicos que detectan la actividad fosfolipasa de las especies patógenas *L. monocytogenes* y *L. ivanovii*.

El Agar *Listeria* Brilliance (Oxoid) es una modificación de la fórmula descrita por Ottaviani y Agosti (Agar ALOA) este medio que contiene un X-glucósido, cromógeno que se escinde por la enzima β -glucosidasa, común de todas las especies de *Listeria*, dando lugar a colonias de color azul-verde. La especie patógena *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* son diferenciadas por su capacidad de producir la enzima fosfolipasa C (factor de virulencia), denominada lecitinasa. Esta enzima hidroliza la lecitina presente en el medio, produciendo un halo blanco opaco alrededor de la colonia azul-verde e identificándose como *L. monocytogenes* la mayoría de las veces, puesto que *L. ivanovii* es encontrada raramente en muestras de alimentos.

En los últimos años, el extraordinario auge de la biología molecular ha conducido al desarrollo de técnicas que permiten la identificación rápida de microorganismos específicos a partir de muestras de alimentos. Entre estas técnicas, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una herramienta efectiva, muy sensible, rápida y con un enorme potencial (Aymerich *et al.*, 2003). La PCR es un método “*in vitro*” de

síntesis de ácidos nucleicos por el cual un segmento en particular de ADN del organismo de interés es específicamente replicado, marcado por un par de cebadores o primers que indican el comienzo de la secuencia a replicar, la cual se somete a repetidos ciclos de desnaturalización, alineación y extensión con la enzima *Taq* ADN Polimerasa, obteniéndose así múltiples copias de la secuencia escogida del ADN (Bubert *et al.*, 1999). Esta técnica permite un rápido diagnóstico, mediante el cual es posible obtener al mismo tiempo, la identificación de diferentes características genotípicas, como por ejemplo género y especie (Norton y Batt, 1999; O` Connor *et al.*, 2000).

La PCR además de su utilidad en la identificación de patógenos como *L. monocytogenes* en alimentos, ha sido utilizada por varios investigadores para la identificación de los principales serotipos de esa especie (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) y todos han demostrado que el método resulta una alternativa que ahorra tiempo, abarata costos y es rápido y confiable en comparación a la clásica y laboriosa serotipificación (Doumith *et al.*, 2004; Chen y Stephen, 2007).

Las especies del género *Listeria* no parecen ser causa de infecciones en los alimentos de origen marino y, no tienen en éstos a un reservorio natural. Sin embargo, se ha señalado que se encuentran en sedimentos de ríos y en las aguas tanto dulces como marinas, por lo que pueden hallarse en estos alimentos como un contaminante proveniente del medio acuático (Ben Embarek, 1994). De hecho, éste organismo se ha aislado a partir de pescados y productos pesqueros procedentes de diferentes partes del mundo. Algunos autores como Morillo *et al.* (2007) aislaron *L. monocytogenes* en el 0,72% de 275 muestras de cangrejo fresco. El Marrakchi *et al.* (2005) hallaron una incidencia de 6,5% para *Listeria* sp. y 1,5% para *L. monocytogenes* en un total de 479 muestras marinas (agua de mar, sedimentos y mejillones). En Venezuela, Martínez y Villalobos (2004) pudieron aislar e identificar *Listeria* sp. (21,21%) y *L. monocytogenes* (9,09%) de muestras frescas de atún aleta amarilla.

Estudios realizados sobre la incidencia de *L. monocytogenes* en organismos marinos en Venezuela son pocos y sólo se han enfocado hacia el estudio del crecimiento e identificación del microorganismo a nivel de pescados frescos y salados, quesos, embutidos, y en vegetales mínimamente procesados (Martínez y Villalobos, 2004; Villalobos y Martínez, 2007; García *et al.*, 2009; Curtis *et al.*, 2002). Los moluscos bivalvos representan en la economía informal de Cumaná un rubro importante de explotación por su consumo, tanto por los habitantes de la ciudad como por turistas. El consumo de este tipo de alimento puede ser riesgoso sino se siguen estrictas normas de higiene y comercialización, aunado el carácter particular de ser organismos filtradores, que pueden acumular en su interior distintos tipos de patógenos vehiculizados en el agua donde se cosechan (Villalobos y Elguezabal, 2001). Dada la ubicuidad de *Listeria* y la importancia de la circulación de sus especies patógenas en alimentos, se planteó determinar la presencia de *L. monocytogenes* en ostras y pepitonas comercializadas en Cumaná, empleando para ello la detección e identificación por medios convencionales, cromogénico y prueba molecular (PCR).

METODOLOGÍA

Recolección De Las Muestras

Se colectó un total de 50 muestras (25 muestras de pepitonas (*Arca zebra*) y 25 de ostras (*Pinctada imbricata*) de 250 g cada una, que fueron obtenidas de diferentes puntos de venta de la ciudad de Cumaná. Éstas fueron colocadas por separado en bolsas plásticas previamente etiquetadas e identificadas y trasladadas en cavas con hielo, hasta el Laboratorio de Bacteriología del Postgrado en Biología Aplicada, de la Universidad de Oriente, Núcleo de Sucre.

Determinación De pH

El grado de frescura de los moluscos bivalvos se evaluó mediante la determinación del pH, utilizando el método propuesto por la Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN 1315-79), el cual consistió en la homogenización de 10 g de muestras (ostras y pepitonas por separado) en 90 mL de agua destilada. Posteriormente, se filtró y se leyó el valor del pH del filtrado en un pH-metro digital marca IMC modelo 41150.

Aislamiento Convencional De *Listeria* sp.

Para el aislamiento de *Listeria* sp. se trabajó según el Manual Analítico Bacteriológico de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), en su edición N° 7 (1992), el cual consistió en tres etapas:

1. Enriquecimiento: se tomó 25 g de cada muestra de molusco y se colocó por separado en fiolas que contenían 225 mL de caldo de enriquecimiento para *Listeria*

(LEB) (FDA, 1992), y los antibióticos acriflavina, cefotetan, fosfomicina, sulfato de colistina y anfotericina (suplemento Oxford - Oxoid); componentes selectivos que permiten inhibir la flora bacteriana acompañante que pudiera desarrollarse en el medio de cultivo. Se agitó rápidamente y luego se incubó a 30°C por un periodo de 24 horas.

2. Aislamiento: una vez finalizado el periodo de incubación, se sembró por separado con asas de inoculación alícuotas (0,01 mL) de los cultivos enriquecidos, en la superficie de dos series de placas de Petri, las cuales contenían 14 ml de los medios selectivos agar Oxford (Oxoid) y Palcam (Merck). Luego se incubaron a 30°C por 24 y 48 horas. Transcurrido ese periodo, se procedió a examinar las placas respectivas para aislar las colonias características del género *Listeria*. En el medio Oxford, después de las 48 horas, se formaron colonias marrones a negras de aproximadamente 2–3 mm de diámetro, rodeadas de un halo negro. En el medio Palcam se aislaron colonias de aproximadamente 2 mm de diámetro, de color verde grisáceo, con centro hundido y halo negro alrededor. Una vez confirmadas las colonias presuntivas, se transfirieron 5 colonias típicas de los medios de cultivos a caldos de tripticasa de soya con 0,6% de extracto de levadura (Merck) e incubadas a 30°C por 24 horas y se verificó su pureza en agar tripticasa de soya con 0,6% de extracto de levadura incubadas igualmente a 30°C por 24 horas.

3. Identificación: previamente se tomaron colonias puras de las placas con agar tripticasa de soya con 0,6% de extracto de levadura, a las cuales se les realizó frotis y tinción de Gram (TG), donde se corroboró la presencia de bacilos cortos Gram positivos, y se procedió a la identificación del género *Listeria*, con base en las siguientes pruebas:

- a. Prueba de motilidad (MOT) en paraguas a 28°C, en medio comercial Motility test (HiMedia)

- b. Prueba enzimática como la catalasa (CAT) (peróxido de hidrogeno al 30%)
- c. Prueba de hemólisis (HEM) en agar sangre de cordero, donde se estableció la naturaleza y magnitud de la reacción hemolítica, característica que ayudó a diferenciar las especies
- d. Prueba de Vogues-Proskauer (VP)
- e. Reacción de rojo de metilo (RM)
- f. Reducción de los azúcares: manitol (MAN), xilosa (XIL) y ramnosa (RAM)

Se utilizaron cepas certificadas del Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM) como cepas Control, para *Listeria* sp. CVCM 337 y para *L. monocytogenes* CVCM 446.

Aislamiento En Medio Cromogénico De *Listeria monocytogenes*

Se empleó un método alternativo propuesto por las Normas de la Organización Internacional de Estandarización (ISO 11290 - 1: 1997) específico para aislar e identificar cepas de la especie patógena *L. monocytogenes* mediante la utilización de un medio cromogénico “Agar Listeria BrillianceTM” (Oxoid).

Se tomó 25 g de cada muestra de ostra y pepitona, se colocaron por separado en fiolas que contenían 225 mL del ONE Broth Listeria más suplemento de antibióticos (Oxoid) y fueron incubadas a 30°C por 24 horas. Transcurrido ese periodo se tomó con el asa de inoculación un volumen de 0,01 ml y se sembró sobre la superficie de placas de Petri que contenían 14 mL de Agar Listeria Brilliance más suplemento de antibióticos (Oxoid). Se incubaron a 37°C por 24 horas. Finalizado el periodo de incubación, se procedió a confirmar la presencia de las colonias presuntivas de *Listeria* sp. (colonias de color azul verdosas) y *L. monocytogenes* (colonias azul

verdosas con halo blanco opaco alrededor). A las colonias aisladas igualmente se les realizaron las pruebas bioquímicas de identificación del género *Listeria* según la FDA (1992).

Todas las cepas aisladas mediante los dos métodos fueron guardadas a temperatura de 4°C en agar conservación por 24 horas para posteriormente realizar la extracción del ADN genómico.

Extracción De ADN genómico

Previamente cada una de las cepas guardadas en agar conservación fueron reconstituidas en caldo de tripticasa de soya con 0,6% de extracto de levadura e incubadas a 30°C por 24 horas, posteriormente se realizaron siembras de los cultivos en placas de agar tripticasa de soya con 0,6% de extracto de levadura e incubadas a 30°C por 24 horas, finalizada la incubación se tomaron colonias de cada cepa, a las cuales se les realizaron frotis y tinción de Gram, procedimiento realizado para verificar la pureza y viabilidad de las cepas.

Ya comprobado la pureza y viabilidad de las cepas, se transfirieron 5 colonias puras de cada una de las placas de agar tripticasa de soya con 0,6% de extracto de levadura, y se suspendieron por separado en tubos eppendorfs conteniendo 1,5 ml de caldo de enriquecimiento para *Listeria* (LEB). La extracción y purificación de ADN genómico de cada una de las cepas aisladas se realizó por medio del kit de extracción de ADN genómico Wizard-Promega (Madison, Wisconsin), siguiendo las especificaciones del fabricante, las cuales se señalan a continuación.

Inicialmente la solución (tubos eppendorfs con 1,5 µL del caldo cultivado) fue llevada a centrifugación a 5.000 rpm por 5 min, se eliminó ese primer sobrenadante y se añadió luego 600 µl de la solución lisante en el tubo con la resuspensión de células

(precipitado), la cual se mezcló bien sin agitar, invirtiendo el tubo.

Posteriormente se incubó a 80°C por 5 min y se enfrió a temperatura ambiente, y se añadió 3 µl de solución de Rnasa. Nuevamente fue mezclado por inversión 5 a 6 veces e incubado a 37°C por 30 min, se dejó enfriar la muestra y se añadió 200 µl de solución precipitante de proteínas. Luego se mezcló e incubó por 10 min a 65°C. La resuspensión se mezcló bien con vórtex por 20 s, se incubó en hielo por 5 min y fue sometida a otra centrifugación a 14.000 rpm por 5 min a 4°C. Logrados los pasos anteriores, el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio donde se mezcló lentamente con 600 µl de isopropanol. Luego se sometió a una nueva centrifugación a 14.000 rpm por 25 min a 4°C y el precipitado se lavó con 400 µl de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 14.000 rpm por 5 min. Por último, se dejó secar a 37°C, sin exceder en el secado, y se resuspendió en 100 µl de solución rehidratante e incubado a temperatura ambiente por 24 horas. El ADN fue guardado a -20°C para posteriormente realizar los ensayos de PCR.

Ensayos De PCR

La identificación de *Listeria* sp. y *L. monocytogenes* se realizó a través de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), siguiendo la metodología de Doumith *et al.* (2004).

Se procedió a realizar un primer ensayo de PCR con un par de primers *prs*, que reconoce una secuencia señal que codifica para una proteína que participa en el metabolismo de todas las listerias (fosforibosil pirofosfato sintasa), utilizado para identificar la presencia del género *Listeria* (tabla 1). Y luego se realizó un segundo ensayo de PCR para identificar los serotipos más comunes de *L. monocytogenes*, mediante la utilización de 4 pares de primers (tabla 2), que amplifican secuencias

específicas de los serotipos principales de *L. monocytogenes* (1/2a, 1/2b, 1/2c y 4b) (Doumith *et al.*, 2004).

Tabla 1. Secuencia de primers utilizado para identificar la presencia del género *Listeria*

Primer	Secuencia del primer (5´-3´)	Tamaño de la banda esperada
<i>Prs</i>	For - CTGAAGAGATTGCGAAAGAAG Rev - AAAGAAACCTTGGATTTGCGG	370 bp

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados para la identificación de los serotipos más comunes de *L. monocytogenes*

Primer	Secuencia del primer (5´-3´)	Tamaño de la banda esperada	Serotipos identificados
<i>Imo0737</i>	For - GGCTTCAAGGACTTACCC Rev - GATTTCTGCTTGCCATTC	691 bp	<i>L. monocytogenes</i> serovares 1/2a, 1/2c, 3a y 3c
<i>Imo1118</i>	For - GGGTCTTAAATCCTGGAA Rev - GCTTGTTTCGGCATACTTA	906 bp	<i>L. monocytogenes</i> serovares 1/2c y 3c
<i>ORF2819</i>	For - CAAAATGCCAAAACCTCGT Rev - CACTAAAGCCTCCCATTG	471 bp	<i>L. monocytogenes</i> serovares 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e
<i>ORF2110</i>	For - GGACAATTGATTGGTGAA Rev - TCCATCCCTTACTTTGAC	597 bp	<i>L. monocytogenes</i> serovares 4b, 4d y 4e

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 50 µL (mezcla de reacción), que contenían un buffer de *Taq* polimerasa (50 mM Tris HCl, pH 8,3, 10

mM de KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada desoxirribonucleotido trifosfato, 2 unidades de *Taq* polimerasa (Promega), 2 µL del ADN purificado para la reacción y 0,2 µM de primers de oligonucleotidos (cada uno).

El programa de amplificación fue el siguiente: 1 ciclo inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 53°C por 1,15 minutos, 72°C por 1,15 minutos y 1 ciclo a 72°C por 7 minutos para la extensión final. Los productos amplificados por PCR fueron corridos por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, teñido con bromuro de etidio, en buffer TAE 1X a 80 voltios por 1 hora. Las bandas fueron visualizadas en un fotodocumentador Bio-Rad (modelo Universal II).

Cada ensayo de PCR fue realizado utilizando las cepas certificadas *Listeria* sp. CVCM 337 y *L. monocytogenes* CVCM 446, como controles positivos y negativos para certificar la validez del proceso.

RESULTADOS

Valores De pH De Los Moluscos Bivalvos

Los valores promedios del pH de las muestras de ostras y pepitonas comercializadas en la ciudad de Cumaná, pueden observarse en la figura 1. Las muestras de los moluscos bivalvos, mantuvieron un promedio de pH cercano a 6,5.

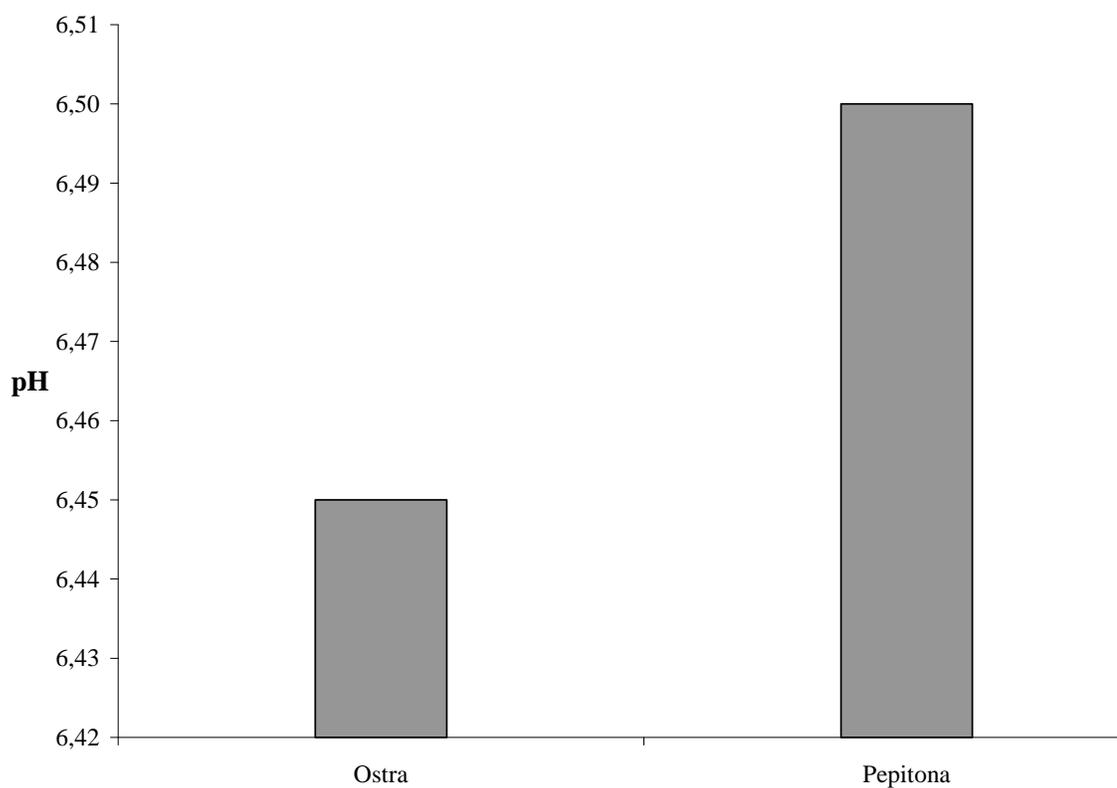


Figura 1. Valores promedios del pH de las muestras de moluscos bivalvos comercializados en la ciudad de Cumaná

La determinación de este parámetro reveló resultados dentro de los límites establecidos por la norma COVENIN 1315-79, la cual establece un rango de pH entre 6,0-6,7 para carnes de organismos marinos frescos.

Aislamiento de *Listeria* sp. y *Listeria monocytogenes* en moluscos bivalvos

De un total de 50 muestras de moluscos bivalvos analizados se obtuvieron 6 muestras presuntivamente contaminadas con *Listeria*, correspondiendo a un 12%, de las cuales resultaron positivas con aislamiento de colonias características del género *Listeria* el 10% de las muestras de pepitonas y el 2% de las muestras de ostras (figura 2).

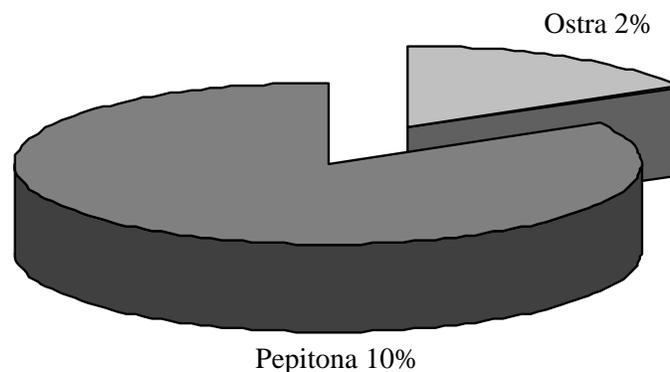


Figura 2. Porcentaje de aislamiento de colonias características del género *Listeria* en moluscos bivalvos (ostras y pepitonas) comercializados en la ciudad de Cumaná

La detección de listerias a través de los medios de cultivos convencionales mostró diferencias en cuanto a la recuperación de colonias típicas del género *Listeria* con respecto a las muestras analizadas. Los medios de cultivo Oxford y Palcam permitieron el aislamiento de colonias con características fenotípicas del género *Listeria* solamente a partir de las muestras de pepitonas (cinco muestras de pepitonas). Sin embargo, las muestras de ostras en éstos medios no arrojaron ningún crecimiento microbiano característico. Al respecto, es importante mencionar el abundante crecimiento de colonias con características similares a las de los géneros *Staphylococcus* spp. y *Lactobacillus* spp observados en las placas de medios de cultivos Oxford y Palcam a partir de las muestras de ostras (figura 3).

Las colonias presuntivas del género *Listeria* aisladas a partir de las muestras de pepitonas presentaron las siguientes características en las placas con los medios convencionales utilizados: elevación convexa, forma circular, borde entero, superficie lisa, estructura uniforme, 2 - 3 mm de diámetro, color verde grisáceo (medio Palcam), color marrón (medio Oxford) con halo negro alrededor y con ausencia y presencia de centro negro hundido (figura 4).

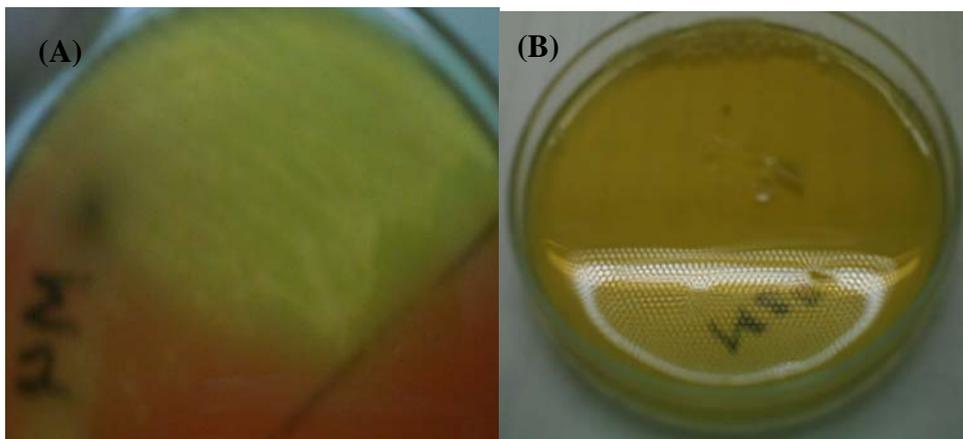


Figura 3. Crecimiento de colonias con características del género *Staphylococcus* spp. (A) y *Lactobacillus* spp. (B) en medios convencionales a partir de las muestras de ostras

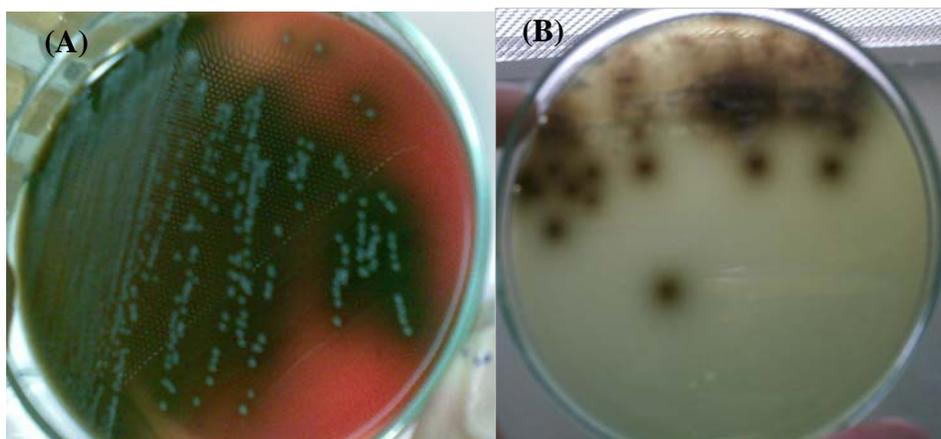


Figura 4. Características morfológicas típicas de las colonias del género *Listeria* aisladas en medios convencionales: Palcam (A) y Oxford (B) a partir de muestras de pepitonas

Las cepas de *Listeria* aisladas mediante los medios convencionales utilizados mostraron características bioquímicas comunes al género, sin embargo, diferencias en la fermentación de los azúcares (manitol, ramnosa, xilosa) y la prueba de hemólisis en agar sangre de cordero al 5%, permitieron identificar la presencia presuntiva de la especie no patógena *L. innocua* en muestras de pepitonas e indicando la ausencia presuntiva de la especie patógena *L. monocytogenes* (tabla 3).

Por otra parte, la utilización del medio cromogénico “Agar Listeria Brilliance” demostró la ausencia de la especie patógena *L. monocytogenes* en las muestras de moluscos bivalvos analizadas, puesto que no se observó crecimiento de colonias azul verdosas rodeadas por halos blancos opacos. Sin embargo, si hubo el crecimiento de colonias pequeñas de aproximadamente 1–2 mm de diámetro, de coloración azul verdosas, con ausencia de halos blancos opacos (figura 5) a partir de cinco muestras de pepitonas y en una muestra de ostra, indicando la presencia presuntiva de especies no patógenas de *Listeria*.

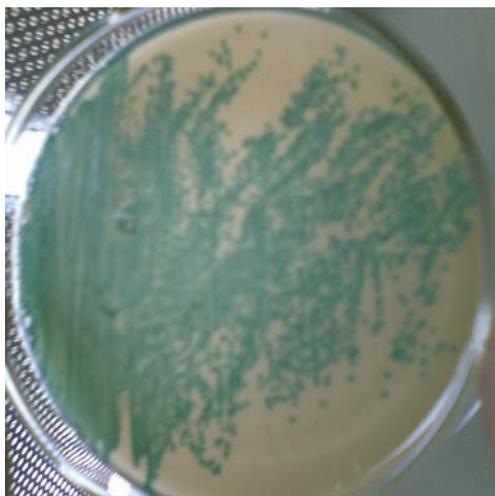


Figura 5. Características morfológicas de colonias de *Listeria* sp. no patógenas en medio cromogénico “Agar Listeria Brilliance”

Los aislamientos realizados mediante el medio cromogénico coincidieron con los

aislamientos efectuados a través de los medios Palcam y Oxford para las muestras de pepitonas y un único aislamiento presuntivo en muestras de ostras. Todas las cepas de *Listeria* aisladas mostraron igualmente características bioquímicas típicas del género, e indicaron igualmente la presencia presuntiva de *L. innocua* debido a su característica no hemolítica que la diferencia de las especies patógenas (hemolíticas) y la fermentación de los azúcares utilizados (tabla 3).

En este estudio se evidenció falsos positivos para *L. monocytogenes* mediante el uso del medio cromogénico “Agar Listeria Brilliance” a partir de algunas muestras de ostras. A través de este medio de cultivo se obtuvieron crecimientos de cepas sospechosas de *L. monocytogenes*, es decir, colonias azul verdosas rodeadas por halo blanco opaco (características descritas por el fabricante del medio) (figura 6), que al realizarle la tinción de Gram se pudo observar que esas colonias sospechosas del patógeno no mostraban la morfología característica de ésta especie, como es su forma bacilar corta Gram positiva; en su lugar, se observaron bacilos largos Gram positivos (figura 7), presumiblemente debido a la presencia de floras acompañantes Gram positivas presentes en las muestras de ostras.



Figura 6. Crecimientos de cepas sospechosas de *L. monocytogenes* (colonias azul verdosas rodeadas por halo blanco opaco) en el medio cromogénico a partir de muestras de ostras



Figura 7. Bacilos largos Gram positivos no comunes de *L. monocytogenes*

Tabla 3. Pruebas bioquímicas diferenciales realizadas para la identificación de cepas de *Listeria sp.* aisladas en pepitonas (P) y ostra (O)

Cepa	TG	CAT	MOT	RM	VP	MAN	RAM	XIL	HEM
P-03	B(+)	+	+	+	+	-	+	-	-
P-10	B(+)	+	+	+	+	-	+	-	-
P-13	B(+)	+	+	+	+	-	+	-	-
P-17	B(+)	+	+	+	+	-	+	-	-
P-23	B(+)	+	+	+	+	-	+	-	-
O-23	B(+)	+	+	+	+	-	+	-	-

TG: Tinción Gram, CAT: Catalasa, MOT: Motilidad, RM: Rojo de Metilo, VP: Vogues Proskauer, MAN: Manitol, RAM: Ramnosa, XIL: Xilosa, B(+): Bacilo gram positivo

El desempeño de los tres medios de aislamiento para *L. monocytogenes* en términos de tipo de muestra (pepitonas y ostras) no fue investigado debido al bajo número de muestras positivas para *Listeria sp.* y la ausencia presuntiva de *L. monocytogenes*.

Detección de *Listeria* sp. y *L. monocytogenes* mediante ensayos de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)

A todas las cepas aisladas e identificadas por ambos métodos (5 cepas aisladas por medios convencionales (5 de pepitonas) y 6 cepas aisladas por el medio cromogénico (5 de pepitonas y 1 de ostra) se les aplicaron ensayos de PCR para la identificación molecular de *Listeria* sp. y de los serovares de *L. monocytogenes*. La especificidad del método PCR fue confirmada utilizando cepas certificadas (*Listeria* sp. CVCM 337 y *L. monocytogenes* CVCM 446).

El primer ensayo de PCR reveló la especificidad del par de primers *prs*, el cual fue utilizado en este estudio para identificar la presencia del género *Listeria* (Doumith *et al.*, 2004). Las corridas electroforéticas de los productos amplificados mostraron seis bandas de aproximadamente 370 bp (figura 8), confirmando que las 6 cepas aisladas pertenecían al género *Listeria* (5 procedentes de pepitonas y 1 de ostra) y corroborando los resultados obtenidos a través de los métodos microbiológicos.

Un segundo ensayo de PCR fue realizado para identificar los 4 serotipos principales de *L. monocytogenes* con primers específicos de los serotipos de este patógeno (*Imo0737*, *Imo1118*, *ORF2819* y *ORF2110*) (Doumith *et al.*, 2004). La corrida electroforética reveló que los primers usados para la identificación de los principales serotipos de *L. monocytogenes*, no produjeron ningún producto de PCR (figura 9). Esta ausencia de fragmentos amplificados indicaron que las 6 muestras positivas a la identificación de *Listeria* sp., no presentaban contaminación por ninguno de los serotipos más comunes de la especie patógena *L. monocytogenes*.

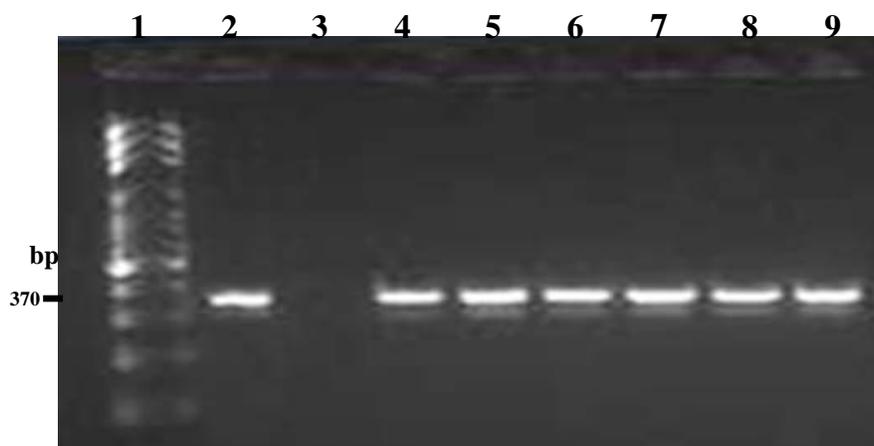


Figura 8. Productos de PCR específicos de *Listeria* sp. con primers prs. Pozos: 1- marcador de peso molecular; 2- control positivo; 3- control negativo; 4 al 9- muestras positivas para *Listeria* sp.

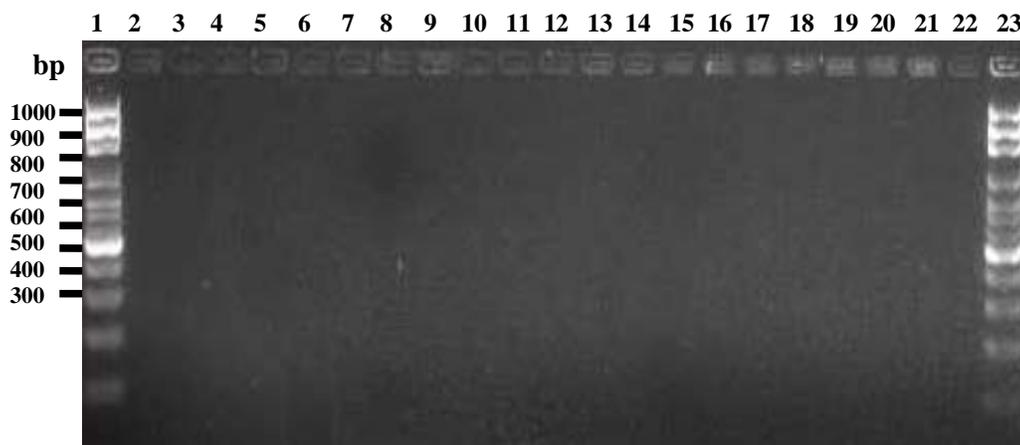


Figura 9. Corrida electroforética para la identificación de los serotipos de *Listeria monocytogenes* con los primers Imo0737, Imo1118, ORF2819 y ORF2110. Pozos: 1 y 23- marcador de peso molecular; 2 al 22- muestras negativas para serotipos de *L. monocytogenes* con ausencia de productos de amplificación

DISCUSIÓN

El pH es un parámetro indicador de la calidad de un producto, por lo tanto es de suma importancia, no sólo desde el punto de vista de su estabilidad, sino también porque su valor está relacionado generalmente con otros atributos que determinan la aceptabilidad del mismo como el sabor, el color, la consistencia y textura, entre otros (Cabello *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos en la determinación del pH como parámetro de frescura en las muestras analizadas, mostraron que los moluscos bivalvos (ostras y pepitonas) comercializados en la ciudad de Cumaná estaban frescos para el momento de su evaluación, presentando valores de pH permitidos por la norma COVENIN (1979) para carnes de organismos marinos frescos. Cabello *et al.*, 2004 reportaron valores de pH similares a los obtenidos en la presente investigación, para moluscos bivalvos *Pinctada imbricata* un pH igual a 6,55 y para *Arca zebra* 6,45; valores que recomendaron como referencia para su inspección.

Los moluscos bivalvos sufren usualmente una alteración de tipo fermentativo a causa de los carbohidratos, que son desdoblados en condiciones anaeróbicas para formar principalmente ácido láctico y alcohol (Jay, 1971). A medida que los moluscos permanecen en almacenamiento su pH tiende a disminuir como una consecuencia de la degradación que experimenta, esto contrasta con los peces y crustáceos en los que aumenta (Cabello *et al.*, 2004).

Los valores de pH reportados en las muestras analizadas (valores promedios de pH: 6,45 en ostras y 6,50 en pepitonas) demostraron que pH próximos a la neutralidad favorecieron probablemente el desarrollo de *Listeria* y específicamente de *L. innocua* en las productos marinos. Se ha establecido que el crecimiento de las listerias está

favorecido en condiciones ligeramente alcalinas o de neutralidad. La Comisión Internacional en Especificaciones Microbiológicas para los Alimentos (ICMSF, 1996), especifica intervalos óptimos de pH entre 6 y 9 para el crecimiento de estos microorganismos.

Autores como Trepát *et al.* (2002) destaca que la inhibición de *L. monocytogenes* en muestras de alimentos va a depender de factores como la temperatura, la actividad de agua y el pH, factores que podrían influir en el desarrollo de floras acompañantes competitivas, que producen metabolitos tóxicos o inhibidores del patógeno, y que posiblemente provocan una disminución acentuada de las concentraciones de éste.

Listeria sp. ha sido aislada a partir de pescados y productos pesqueros procedentes de diferentes partes del mundo (Jallewar *et al.*, 2007). Aislamientos frecuentes a partir de muestras marinas (Rorvik y Yndestad, 1991; Weagant *et al.*, 1989) y la demostración del potencial de proliferación en pescados y mariscos (Ben Embarek, 1994), son pruebas de que los alimentos marinos pueden ser importantes en la transmisión de *L. monocytogenes*.

En este estudio se aislaron cepas del género *Listeria* en un 12% de las muestras de moluscos bivalvos (ostras y pepitonas), empleando medios convencionales (Palcam y Oxford) y un medio cromogénico (Agar *Listeria* Brilliance), ambos métodos demostraron la ausencia presuntiva de cepas de *L. monocytogenes*. El único microorganismo listérico presente en dichas muestras fue *L. innocua* (especie no patógena) detectada mediante la identificación bioquímica.

Según Slade (1992), Jinneman *et al.* (1999) y Bauwens *et al.* (2003) la presencia de especies de *Listeria* como *L. innocua* en un ambiente específico puede indicar la presencia de *L. monocytogenes*, por ende sugieren que *L. innocua* podría ser un excelente indicador de este agente patógeno; puesto que está comprobado que *L.*

innocua puede enmascarar la presencia de *L. monocytogenes* en medios de cultivos (Rijpens *et al.*, 1997).

Algunas investigaciones han afirmado una ventaja selectiva del crecimiento de *L. innocua* sobre *L. monocytogenes* en medios de cultivos, ya sea como resultado de una actividad inhibitoria y/o por tener una velocidad específica de crecimiento superior en los caldos selectivos de *Listeria*, estos autores explican que esas interacciones podrían resultar en un aumento de falsos negativos, y por tanto afectar la tasa de recuperación de *L. monocytogenes* (Due y Schaffner, 1993; Petran y Swanson 1993; Barbosa *et al.*, 1994; McDonald y Sutherland, 1994; Carles *et al.*, 1997; Cornu *et al.*, 2002). Por lo que, en este estudio la ausencia de *L. monocytogenes* en las muestras evaluadas, no puede tomarse como determinante de que los moluscos bivalvos (ostras y pepitonas) expendidos en la ciudad de Cumaná no estén contaminados por cepas de la especie *L. monocytogenes*, debido a la presencia presuntiva de *L. innocua* en dichas muestras.

La distribución y recuperación de las especies de *Listeria* puede variar según el tipo de alimento y la metodología de detección utilizada, aunque las especies aisladas con mayor frecuencia son *L. innocua* y *L. monocytogenes* (Richard *et al.*, 1996). Varios estudios han demostrado que *L. innocua* se encuentra con más frecuencia que *L. monocytogenes* en alimentos, pero no constituye un riesgo para la salud, pues no se considera patógena para el ser humano (Ryu *et al.*, 1992; MacDonald y Sutherland, 1994; Walsh *et al.*, 1998). Estas especies comparten el mismo hábitat ecológico y los mismos requerimientos fisiológicos, por lo tanto pueden crecer en los mismos productos alimenticios. A pesar de ser *L. innocua* la especie filogenéticamente más cercana a *L. monocytogenes*, se diferencian en relación a los requerimientos atmosféricos, que son menos exigentes para *L. innocua* en comparación con el patógeno intracelular, cuya viabilidad puede ser afectada dependiendo de la presión de oxígeno existente en el medio (Jacxsens *et al.*, 2001).

La detección de listerias a través de los medios de cultivos convencionales (Oxford y Palcam) mostró diferencias en cuanto a la recuperación de colonias típicas del género *Listeria* con respecto a las muestras de analizadas. Solamente las muestras de pepitonas mostraron crecimientos de colonias características presuntivas del género *Listeria* (cinco muestras de pepitonas), ésto probablemente debido a la elevada contaminación de flora competitiva o acompañante (*Staphylococcus* spp. y *Lactobacillus* spp.) desarrollada en los medios convencionales a partir en las muestras de ostras, indicando que esos microorganismos no fueron suprimidos por los agentes selectivos de los medios y que tal vez pudieron inhibir el desarrollo de *Listeria* sp. en estos medios de cultivos.

Al respecto, Villani *et al.* (1994) destacan que *Staphylococcus* coagulasa negativa puede sintetizar gran variedad de agentes antimicrobianos tales como enzimas bacteriolíticas y bacteriocinas, que tendrían un efecto antagonista para el crecimiento y desarrollo de *Listeria*. Los lactobacilos también producen ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas que tienen efectos antagónicos en *Listeria* (Piard y Desmazeaud, 1991; Villani *et al.*, 1994; Guerra y Bernardo, 2001). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que el pH observado en las muestras evaluadas no es muy ácido sino con tendencia a la neutralidad, por lo tanto el desarrollo de lactobacilos sería muy lento en las primeras etapas del manejo de las ostras y pepitonas.

Gunasinghe *et al.* (1994) manifestaron que el medio Palcam es más sensible y selectivo que el medio Oxford en el aislamiento de las listerias a partir de muestras de alimentos. En este estudio, se observaron resultados similares donde el medio Palcam brindó un mejor aislamiento de colonias de *Listeria* a partir de moluscos bivalvos. Por otra parte, autores como Bauwens *et al.* (2003) señalaron que los medios de cultivos (Oxford y Palcam) tienen la desventaja de no permitir una diferenciación cultural entre las especies de *Listeria*, y que el aislamiento de las colonias es

obstaculizado por el total ennegrecimiento del medio, debido a la hidrólisis de la esculina presente en el mismo.

El medio cromogénico “Agar Listeria Brilliance” por su parte, demostró la ausencia de la especie patógena *L. monocytogenes* en las muestras de moluscos estudiadas. No obstante, sí mostró la presencia de especies no patógenas en cinco muestras de pepitonas y una de ostra; lo que concuerda con los resultados obtenidos mediante los medios convencionales. Estos resultados demuestran que ambos métodos tanto el convencional como el alternativo fueron efectivos en la identificación de bacterias del género *Listeria* en muestras de moluscos bivalvos.

En relación, Aragon-Alegro *et al.* (2008) explicaron que los resultados obtenidos con medios convencionales (Oxford y Palcam) no pueden ser comparables a los conseguidos con un medio cromogénico específico, puesto que los primeros son un sistema de indicadores sobre la base de la hidrólisis de esculina, que como se mencionó anteriormente es una característica común de todas las *Listeria* sp.; mientras que los medios cromogénicos son específicos para la detección diferencial de *L. monocytogenes* mediante la hidrólisis de la enzima fosfolipasa C, que se evidencia en el medio de cultivo por la presencia de halos blanco opaco alrededor de colonias azul verdosas.

Hegde *et al.* (2007) manifestaron la desventaja de los aislamientos convencionales, que siempre deberán ser sometidos a pruebas bioquímicas de confirmación para identificar *L. monocytogenes* de otras *Listeria.*, que tienden a ser laboriosas, requieren una amplia variedad de medios de cultivos y/o reactivos de confirmación costosos y que acarrear mucho tiempo al tomar varios días para completarse; mientras que aislamientos obtenidos por la gran variedad de medios cromogénicos, como por ejemplo el agar BBL CHROMagar Listeria, son específicos de *L. monocytogenes*, con un alto nivel de selectividad del medio.

En este estudio se evidenció falsos positivos para *L. monocytogenes* mediante el uso del medio cromogénico “Agar Listeria Brilliance” a partir de algunas muestras de ostras. Obteniéndose crecimientos de cepas sospechosas de *L. monocytogenes* (colonias con las características descritas por el fabricante en el medio) que al realizarle las pruebas de identificación como la tinción de Gram, se observaron morfologías bacterianas no comunes del género *Listeria* (bacilos largos Gram positivos), debido probablemente a floras acompañantes Gram positivas presentes en las muestras de ostras, que no posiblemente no fueron suprimidas por los componentes selectivos del medio cromogénico. En esta investigación, se demuestra la importancia de la realización de frotis y tinción de Gram para corroborar la morfología bacteriana característica de las listerias (bacilos cortos Gram positivos) y además para la verificación de la pureza de las colonias.

Vlaemynck *et al.* (2000) en su investigación enfatizan que debe prestarse especial atención a algunas bacterias productoras de fosfolipasa C, tales como *Bacillus* spp. y *Staphylococcus* spp., que podrían inducir falsos positivos en la detección de *L. monocytogenes* en medios cromogénicos, y por lo tanto la presunción de los resultados si se tomaran sólo en cuenta las características morfológicas de las colonias. Asimismo, Bauwens *et al.* (2003) en su estudio encontraron insuficiente la selectividad del medio cromogénico ALOA para prevenir el crecimiento de todos los *Bacillus* spp. mostrando falsos positivos.

Para confirmar los resultados obtenidos en el aislamiento convencional y cromogénico (métodos microbiológicos) se aplicaron ensayos de la reacción en cadena de la polimerasa. El primer ensayo de PCR para la detección de *Listeria* sp. reveló la alta especificidad del par de primers *prs* en la identificación del género (Doumith *et al.*, 2004). Las 6 cepas aisladas e identificadas del género *Listeria* a través de los medios convencionales y cromogénico, fueron confirmadas como *Listeria* sp. mediante la técnica PCR.

Por otra parte, a través de un segundo ensayo de PCR, se demostró la ausencia de los principales serotipos de *L. monocytogenes* en las muestras de moluscos bivalvos evaluadas. Concordando estos resultados con los obtenidos mediante los métodos microbiológicos, no obstante estos resultados mostraron la ventaja de la técnica PCR sobre los métodos microbiológicos, no sólo por su mayor sensibilidad y especificidad sino también por el menor tiempo requerido para obtener resultados concretos (Villalobos y Martínez, 2007).

En la actualidad el método principal para la detección de *L. monocytogenes* y otras especies de *Listeria* en muestras de alimentos siguen siendo los procedimientos microbiológicos convencionales (Allerberger, 2003). Sin embargo, se han descrito numerosos ensayos de PCR para la detección de *L. monocytogenes* en alimentos, que han resultado más sensibles y específicos (Borucki y Call, 2003; Levin, 2003; Rivera *et al.*, 2006; Gallegos *et al.*, 2007). La PCR es considerada más fiable que la identificación convencional, ya que se basa en características genotípicas estables, en lugar de basarse en características fisiológicas o bioquímicas que pueden ser genéticamente inestables (Lawrence y Gilmour, 1994).

Los análisis microbiológicos son procedimientos estándar indispensables en la búsqueda y control de microorganismos patógenos en alimentos, donde se aíslan las cepas a partir de muestras de alimentos (cultivos puros), pasos previos y necesarios para realizar la identificación específica de la bacteria mediante ensayos de PCR. Es por esto, que los procedimientos microbiológicos convencionales no serán desplazados totalmente dentro de los esquemas para el control microbiológico, ya que sus principios son necesarios para complementar la aplicación de la técnica PCR (Rivera *et al.*, 2006).

Listeria sp. ha sido aislada con menos frecuencia de ambientes marinos que las

bacterias entéricas tales como *Salmonella* o *Escherichia coli* (Monfort *et al.*, 2000). Un estudio realizado en muestras de pescados frescos y muestras ambientales del sector pesquero minorista del norte de Grecia (Soulto *et al.*, 2007), reporta una incidencia global de *Listeria* spp. del 4% en pescados, conformado por los organismos *L. innocua* (3%) y *L. monocytogenes* (1%). Sin embargo, refiere que fue más alto el nivel de contaminación de *Listeria* en las muestras ambientales, predominando *L. innocua*. Según estos autores la presencia elevada de este microorganismo probablemente se debió a condiciones sanitarias deficientes y mala manipulación por parte de los expendedores de ese sector pesquero.

La presencia de *Listeria* sp., en pepitonas y ostras expandidas en la ciudad de Cumana indican que el proceso de manipulación de estos alimentos podría propiciar la entrada de cepas patógenas y que *Listeria* sp. podría ser residente potencial de los locales de desconchados de los moluscos y puntos de ventas de los mismos; lo que debe alertar a las autoridades sanitarias a ejercer un mejor control sanitario en cuanto a la manipulación, conservación del producto y de las condiciones higiénicas en los distintos sitios de expendios de los moluscos bivalvos.

CONCLUSIONES

Los valores de pH obtenidos en las muestras de pepitonas y ostras comercializadas en la ciudad de Cumaná estaban dentro de los límites permitidos por COVENIN

El 12% de las muestras analizadas fueron positivas para el género *Listeria*, ninguna de las muestras mostró la presencia de *L. monocytogenes*

El método convencional y el método cromogénico demostraron la ausencia *L. monocytogenes* y evidenciaron la presencia de la especie *L. innocua* como único organismo listérico presente en las muestras evaluadas

La identificación por PCR confirmó la presencia de cepas positivas a *Listeria* sp. y demostró que ninguna de las muestras positivas estaban contaminadas por serotipos de *L. monocytogenes*

El aislamiento de *Listeria* sp. puso en evidencia condiciones sanitarias inadecuadas de manipulación, conservación y expendio de estos moluscos bivalvos en la ciudad de Cumaná, que podrían propiciar la entrada de cepas de *L. monocytogenes*

RECOMENDACIONES

Realizar análisis microbiológicos de estos productos periódicamente, para descartar la presencia de *L. monocytogenes* y otras especies de *Listeria*.

El Ministerio de Sanidad debe exigir y supervisar periódicamente el cumplimiento de las normas higiénico-sanitarias en la manipulación, conservación de moluscos bivalvos y en los distintos sitios de expendios de estos productos en la ciudad, a fin de evitar la entrada de cepas patogénicas como *L. monocytogenes*.

Concientizar a la población cumanesa y a los expendedores, mediante campañas educativas sobre el manejo inadecuado de alimentos para su consumo y la necesidad de guardar normas higiénico-sanitarias básicas.

BIBLIOGRAFÍA

Allerberger, F. 2003. *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 35: 183–189.

Aragón-Alegro, L.; Casale, D.; Zangiacomi, E.; Landgraf, M.; Gombossy, B. y Destro, M. 2008. Performance of a chromogenic medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* in food. *Food Control*, 19: 483–486

Aymerich, M.; Martín, B.; Garriga, M. y Hugas, M. 2003. Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic Staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69: 4583-4594

Barbosa, W.; Cabedo, L.; Wederquist, H.; Sofos, J. y Schmidt, G. 1994. Growth variation among species and strains of *Listeria* in culture broth. *J. Food Protect.*, 57: 765–775.

Bauwens, L.; Vercammen, F. y Hertsens, A. 2003. Detection of pathogenic *Listeria* spp. in zoo animal faeces: use of immunomagnetic separation and a chromogenic isolation medium. *Vet. Microbiol.*, 91: 115–123

Bell, C. y Kyriakides, A. 2000. *Listeria. Una aproximación práctica al microorganismo y su control en los alimentos*. Zaragoza. Acribia S.A. España.

Ben Embarek, P. 1994. Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *Intl. J. Food Microbiol.*, 23: 17-34.

Beumer, R. y Hazeleger, W. 2003. *Listeria monocytogenes*: diagnostic problems.

FEMS Immunol. Med. Microbiol., 35: 191– 197.

Bille, J.; Rocourt, J. y Swaminathan, B. 2003. *Listeria* and *Erysipelothrix*. In: *Manual of clinical microbiology*. Murray, P.(ed). ASM Press. Washington, DC, USA.

Borucki, M. y Call, D. 2003. *Listeria monocytogenes* Serotype Identification by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 41 (12): 5537–5540.

Brooks, J.; Daneshvar, M.; Malcolm, G. y Pino, L. 1989. Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Canadian J. Microbiol.*, 35: 245-54.

Bubert, A.; Hein, I.; Rauch, M.; Lehner, A.; Byoungsu, Y.; Werner, G. y Wagner, M. 1997. Isolation of catalase–negative *Listeria monocytogenes* strains from listeriosis patients and their rapid identification by anti–p60 antibodies and/or PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 35: 179-183.

Bubert, A.; Hein, I.; Rauch, M.; Lehner, A.; Byoungsu, Y.; Werner, G. y Wagner, M. 1999. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(10): 4688-4692.

Cabello, A.; Villarroel, R.; Figuera, B.; Ramos, M.; Márquez, Y. y Vallenilla, O. 2004. Parámetros de frescura de moluscos. *Rev. Cient., FCV-LUZ*, 14(5): 457-466

Callejo, R.; Prieto, M.; Martínez, C.; Aguerre, L.; Rocca, F.; Martínez, G. y Palmieri, O. 2008. Estudio mediante PCR múltiple de serotipos de *Listeria monocytogenes* aislados en Argentina. *Rev. Argentina Microbiol.*, 40: 89-92.

Carles, B.; Jaquet, C.; Duthoit, M.; Facon, J. y Rocourt, J. 1997. Evaluation d'un nouveau milieu de culture pour la de´tection rapide de *Listeria monocytogenes* dans

les produits alimentaires: RAPID'L.MONO. *Sanofi information. Steenvoorde, France: Sanofi Diagnostics Pasteur Laboratory.*

Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM). 2006. Instituto de Biología Experimental Universidad Central de Venezuela.

Chasseignaux, E.; Toquin, M.; Ragimbeau, C.; Salvat, G.; Colin, P. y Ermel, G. 2001. Molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* isolates collected from the environment, raw meat and raw products in two poultry-and pork processing plants. *J. Appl. Microbiol.*, 91: 888-899.

Chen, Y. y Stephen, J. 2007. Multiplex PCR for simultaneous detection of bacteria of the genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, and major serotypes and epidemic clones of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(19): 6299-6304.

Cocolin, L.; Rantsiou, K.; Iacumin, L.; Cantoni, C. y Comi, G. 2002. Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(1): 6276-6282

Cole, M.; Jones, M. y Holyoak, C. 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, 69: 63-72.

Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN). 1979. Alimentos. Determinación de pH (Acidez iónica). Norma 1315-79. Caracas, Venezuela.

Consessotto, C.; Avilés, M. y Gutierrez, J. 1997. Meningitis por *Listeria monocytogenes* en niño inmunocompetente. *Rev. Esp. Pediatr.*, 53: 458-461.

Cornu, M.; Kalmokoff, M. y Flandrois, J. 2002 Modelling the competitive growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in enrichment broths. *Int. J. Food Microbiol.*, 73: 261–274

Crum, N. 2002. Update on *Listeria monocytogenes* infection. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, 4, 287–296.

Doumith, M.; Buchrieser, C.; Glaser, P.; Jacquet, C. y Martin, P. 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 42(8): 3819-3822.

Doumith, M.; Cazalet, C.; Simoes, N.; Frangeul, L.; Jacquet, C.; Kunst, F.; Martin, P.; Cossart, P.; Glaser, P. y Buchrieser, C. 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.*, 72:1072–1083.

Due, Y. y Schaffner, D. 1993. Modeling the effect of temperature on the growth rate and lag time of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.*, 56: 205–210

El Marrakchi, A.; Boum'handi, N. y Hamama, A. 2005. Performance of a new chromogenic plating medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* from marine environments. *Lett. Appl. Microbiol.*, 40: 87–91.

Espinoza, A.; De la Torre, M.; Salinas, M. y Sánchez, V. 2004. Determinación de *Listeria monocytogenes* en quesos frescos de producción artesanal que se expenden en los mercados del distrito Ica, enero – marzo 2003. *Rev. Med. Exp. Salud. Pub.*, 21(2): 55–62.

Farber, J. y Peterkin, P. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol. Rev.*, 55(3): 476-511.

Felsdine, P.; Lienau, A.; Forgey, R. y Calhoun, R. 1997. Assurance polyclonal enzyme immunoassay (EIA) for detection of *Listeria monocytogenes* and related *Listeria* species in selected foods: collaborative study. *J. AOAC. Int.*, 80: 775–790.

Food and Drug Administration (FDA). 1992. *Bacteriological Analytical Manual* (BAM). Chapters 10 and 11. Seventh edition. Washington, D.C.

Food and Drug Administration (FDA). 2001. State and Federal Microbiological Standards and Guidelines. Food and Drug Administration. Washington, D. C.

Frazier, W. y Westhoff, D. 1993 *Microbiología de los alimentos*. Segunda edición. Editorial Acribia S.A. Zaragoza. España.

Gallegos, J.; Arrieta, G.; Máttar, S.; Poutou, R. y Trespalacios, A. 2007. Frecuencia de *Listeria* spp., en quesos colombianos costeños. *Rev. MVZ Córdoba*, 12: 996-1012.

García, N.; Villalobos, L.; Martínez, R. 2009. Caracterización de cepas de *Listeria* aisladas de embutidos comercializados en Cumaná, estado Sucre, Venezuela. *Ciencia*, 17(2): 133-140.

Gasánov, U.; Hughes, D. y Hansbro, P. 2005. Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 851 – 875.

Guerra M. y Bernardo F. 2001. Caracterização de efeitos inibidores *Listeria monocytogenes* Scott A, produzidos pela microflora de maturação de queijos do

lentejo. *Rev. Port. Cient. Vet.*, 96(538): 65-9.

Gunasinghe, C.; Henderson, C. y Rutter, M. 1994. Comparative study of two plating media (Palcam and Oxford) for detection of *Listeria* spp. in a range of meat products following a variety of enrichment procedures. *J. Appl. Microbiol.* 18: 156–158.

Hegde, V.; Leon-Velarde, C.; Stam, C.; Jaykus, L. y Odumeru, J. 2007. Evaluation of BBL CHROMagar Listeria agar for the isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from food and environmental samples. *J. Microbiol. Meth.*, 68: 82–87

Huang, Y.; Chen, S.; Wu, M.; Chen, C.; Hsieh, W.; Tsao, B.; Horng, C y Hsueh, P. 2006. Molecular evidence for vertical transmission of listeriosis, Taiwan. *J. Med. Microbiol.*, 55:1601-1603.

International Commission on Microbiological Specifications for Food (ICMSF). 1996. *Listeria monocytogenes*. In Microorganisms in Foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. London. Págs. 141-182.

ISO 11290-1. 1997. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*.

Jacxsens, L.; Devlieghere, F.; Van der Steen, C. y Debevere, J. 2001. Effect of high oxygen modified atmosphere packing on microbial growth sensorial qualities of fresh-cut produce. *Int J. Food Microbiol.*, 71(2): 197-210.

Jallewar, P.; Kalorey, D.; Kurkure, N.; Pande, V. y Barbuddhe, S. 2007. Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *Int. J. Food Microbiol.*, 114: 120–123

Jay, J. 1971. *Microbiología moderna de los alimentos*. Editorial Acribia. Zaragoza. España. Pág. 320.

Jinneman, K.; Wekell, M. y Eklund, M. 1999. Incidence and behaviour of *L. monocytogenes* in fish and seafood products. In: *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Ryser, E. y Marth, E. (eds). Marcel Dekker, New York, EE.UU.

Jones, D. 1992. Current classification of the genus *Listeria*. In: *Listeria 1992. Abstracts of ISOPOL XI*, Copenhagen, Denmark.

Joyce, E.; Chan, K.; Salama, N. y Falkow, S. 2002. Redefining bacterial populations: a post-genomic reformation. *Nat. Rev. Genet.*, 6: 462-473.

Kells, J. y Gilmour, A. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in two milk processing environments, and assessment of *Listeria monocytogenes* blood agar for isolation. *Int. J. Food Microbiol.*, 91: 167-174.

Lawrence, L. y Gilmour, A. 1994. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60(12): 4600-4604

Levin, R. 2003. Application of the polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: a review of methodology. *Food Biotechnol.*, 17: 99-116.

MacDonald, F. y Sutherland, A. 1994. Important differences between the generation times of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in two *Listeria* enrichment broths. *J. Dairy Res.*, 61: 433-436.

Martínez, R. y Villalobos, L. 2004. Aislamiento de *Listeria monocytogenes* en atún

fresco expandido en la ciudad de Cumaná, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ.*, 14(4): 354-357.

McLauchlin, J. 1997a. The Pathogenicity of *Listeria monocytogenes*: A public health perspective. *Rev. Med. Microbiol.*, 8(1): 1-14.

McLauchlin, J. 1997b. The identification of *Listeria* species. *Int. J. Food Microbiol.*, 38: 77-81.

Monfort, P.; Piclt, G. y Plusquellec, A. 2000. *Listeria innocua* and *Salmonella panama* in estuarine water and seawater: a comparative study. *Water Record*, 34: 983-989.

Morillo, N.; Rondon, I.; Valero-Leal, K. y Uzcátegui-Bracho, S. 2007. Bacterias patógenas en carne de cangrejo comercializado fresco y pasteurizado. Maracaibo, Venezuela. *Rev. Cient. FCV-LUZ.*, 17(3): 288-293

Nolan, D.; Chamblin, D. y Troller, J. 1992. Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *Intl. J. Food Microbiol.*, 16: 323-335.

Norton, D. y Batt, C. 1999. Detection of viable *Listeria monocytogenes* with a 5' nuclease PCR assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(5): 2122-2127.

O'Connor, L.; Joy, J.; Kane, M.; Smith, T.; y Maher, M. 2000. Rapid polymerase chain reaction/DNA probe membrane-based assay for the detection of *Listeria* and *Listeria monocytogenes* in food. *J. Food Protect.*, 63(3): 337-342.

Ornaque, I.; Valderiola, F. y González, J. 1997. Hidrocefalia aguda y absceso

cerebral en meningitis por *Listeria monocytogenes*. *Neurol.*, 7(12): 317–318.

Paillard, D.; Dubois, V.; Duran, R.; Nathier, F.; Guittet, C.; Caumette, P. y Quentin, C. 2003. Rapid Identification of *Listeria* Species by Using Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 23S rRNA Gene Fragments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(11): 6386–6392.

Petran, R. y Swanson, K. 1993. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *J. Food Protect.*, 56: 616–618.

Piard, J. y Desmazeaud, M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: oxygen metabolites and end products from catabolism. *Lait*, 71: 525-541.

Prescott, L.; Harley, J. y Donald, K. 2004. *Microbiología*. Quinta edición. McGraw-Hill Interamericana. España.

Reissbrodt, R. 2004. New chromogenic plating media for detection of pathogenic *Listeria* spp. – an overview. *Int. J. Food Microbiol.*, 95:1–9.

Richard, N.; Audiger, M.; Beaudoin, B.; Duval, M.; Gey, J.; Jardy, N.; Jouvenel, A.; Michard, J. y Rosec, J. 1996. Fréquence de contamination d'aliments du marché français de détail par les différentes espèces de *Listeria*. *Microbiol. Aliment. Nutr.*, 14: 255– 262.

Rijpens, N.; Jannes, G. y Herman, L. 1997. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken and turkey products determined by polimerasa chain reaction and line probe assay hybridization. *J. Food Protect.*, 60(5): 548-550.

Rivera, F.; Wesley, I.; Hurd, S.; Simoes, D.; Sosa, A. y Rivera, S. 2006.

Determinación microbiológica y molecular de *Listeria* spp. y *Listeria monocytogenes* en cerdas a nivel de una planta beneficiadora en EUA. *Rev. Cient. FCV-LUZ.*, 16(3): 297-307.

Rocourt, J.; Boerlin, P.; Grimont, F.; Jacquet, C y Piffaretti, J. 1992. Assignmet of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 42: 171-174.

Rocourt, J.: Jacquet, C. y Reilly, A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. *Int. J. Food Microbiol.*, 62: 197-209.

Rorvik, L. y Yndestad, M. 1991. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. *Int. J. Food Microbiol.*, 13: 97-104,

Ryan, K.; Ray, G. y Sherris, J. 2004. *Microbiología Médica*. Cuarta Edición. Editorial McGraw – Hill Interamericana Editores S.A de C.V. Ciudad de México – México

Ryu, C.; Igimi, S.; Inoue, S. y Kumagai, S. 1992. The incidence of *Listeria* species in retail foods in Japan. *Int. J. Food Microbiol.*, 16: 157–160.

Slade, P. 1992. Monitoring *Listeria* in the food production environment. I. Detection of *Listeria* in processing plants and isolation methodology. *Food Res. Int.*, 25: 45–56.

Scotter, S.; Langton, S.; Lombard, B.; Schulten, S.; Nagelkerke, N.; Veld, P.; Rollier, P. y Lahellec, P. 2001. Validation of ISO method 11920 Part 1. Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Intl. J. Food Microbiol.*, 64: 295-306.

Smith, P.; Mellors, D.; Molroyd, A. y Gray, C. 2001. A new chromogenic medium

for the isolation of *Listeria* spp. *Lett. Appl. Microbiol.*, 32: 70-82.

Soultos, N.; Abraham, A.; Papageorgiou, K. y Steris, V. 2007. Incidence of *Listeria* spp. in fish and environment of fish markets in Northern Greece. *Food Control*, 18: 554–557

Southwick, F. y Purich, D. 1996. Intracellular pathogenesis of listeriosis. Review articles. *New Engl. J. Med.*, 334(12): 770-776.

Torres, K.; Sierra, S.; Poutou, R.; Vera, H.; Carrascal, A. y Mercado, M. 2004. Incidencia y diagnóstico de *Listeria monocytogenes*; microorganismo zoonótico emergente en la industria de alimentos. *Rev UDCA Act. Divulg. Cient.*, 7(1): 25-57.

Torres, K.; Sierra, S.; Poutou, R.; Carrascal, A. y Mercado, M. 2005. Patogénesis de *Listeria monocytogenes*, microorganismo zoonótico emergente. *MVZ-Córdoba*, 10(1): 511-543.

Trepal, M. 2002. Incidencia y comportamiento de *Salmonella* y *Listeria* en pechugas de pavos curadas. Tesis doctoral. Facultad de Medicina Veterinaria. Universidad Autónoma de Barcelona - España.

Uhtil, S.; Jaksic, S.; Petrak, T.; Medic, H. y Gumhalter-Karolyi, L. 2004. Prevalence of *Listeria monocytogenes* and the other *Listeria* spp. in cakes in Croatia. *Food Control*, 15: 213–216

Vásquez-Boland, J.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Dominguez-Bernal, G.; Gobel, W.; González, B.; Wehland, J. y Kreft, J. 2001. *Listeria*, pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(3): 584-640.

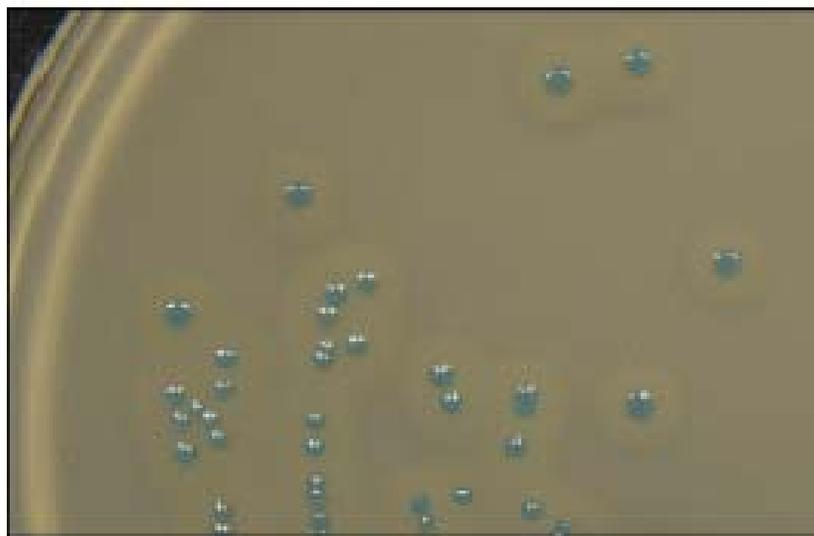
- Vázquez, J.; Domínguez, G.; González, B.; Kreft, J. y Goebel, W. 2001. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Microbiol. Infect.*, 3: 571-584.
- Villalobos, L. y Elguezabal, L. 2001. Microbiological quality of the bivalve *Pinctada imbricata* commercialized in Cumaná, Venezuela. *Acta Cient. Ven.*, 52(1): 55-61.
- Villalobos, L. y Martínez, R. 2007. Aislamiento e identificación por métodos convencionales y PCR de *Listeria monocytogenes* en quesos blancos frescos comercializados en Cumaná, Venezuela. *Rev. Cient., FCV-LUZ*, 17(5): 529-536.
- Villani, F.; Pepe, O.; Mauriello, G.; Salzano, G.; Moschetti, G. y Coppola, S. 1994. Antimicrobial activity of *Staphylococcus xylosus* from italian sausages against *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 18: 159-161.
- Vlaemynck, G.; Lafarge, V. y Scotter, S. 2000. Improvement of the detection of *Listeria monocytogenes* by the application of ALOA, a diagnostic, chromogenic isolation medium. *J. Appl. Microbiol.*, 88(3): 430-441.
- Walsh, D.; Duffy, G.; Sheridan, J.; Blair, I. y McDowell, D. 1998. Comparison of selective and non-selective media for the isolation of *Listeria* species from retail foods. *J. Food Safety*, 18: 85-89.
- Weagant, S.; Sado, P. y Colburn, K. 1989. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Prot.*, 51: 655-657.
- Wiedmann, M.; Bruce, J.; Keating, C.; Johnson, A.; McDonough, P. y Batt, C. 1997. Ribotypes and virulence gene polymorphisms suggest three distinct *Listeria monocytogenes* lineages with differences in pathogenic potential. *Infect. Immun.*, 65: 2707 – 2716.

ANEXOS

Anexo 1. Identificación bioquímica y características diferenciales del género *Listeria* (Gasánov et al., 2005)

Pruebas	<i>L. mono</i>	<i>L. inn</i>	<i>L. iva</i>	<i>L. see</i>	<i>L. wel</i>	<i>L. gra</i>
Hemólisis	+	-	+	+	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-
L-Ramnosa	+	+/-	-	-	+/-	+/-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	+
D-Xilosa	-	-	+	+	+	-

L. mono: *L. monocytogenes*, *L. inn*: *L. innocua*, *L. iva*: *L. ivanovii*, *L. see*: *L. seeligeri*, *L. wel*: *L. welshimeri*, *L. gra*: *L. grayi*



Anexo 2. Colonias de *L. monocytogenes* que crecen en el medio cromogénico denominado BBL CHROMagar *Listeria* ¶después de 24 h de incubación a 35°C (azul verdosas rodeadas por halos blancos opacos) (Hegde et al., 2007)

HOJA DE METADATOS

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 1/5

Título	Identificación por cultivos convencionales, cromogénico y PCR de <i>Listeria monocytogenes</i> en moluscos bivalvos comercializados en la ciudad de Cumaná, Venezuela.
Subtítulo	

Autor(es)

Apellidos y Nombres	Código CVLAC / e-mail	
Méndez Pérez Paola Johana	CVLAC	16 997 420
	e-mail	paomendez2007@hotmail.com
	e-mail	

Palabras o frases claves:

Listeria sp., *Listeria monocytogenes*, Ostras, Pepitonas.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 2/5

Líneas y sublíneas de investigación:

Área	Subárea
Ciencias	Biología

Resumen (abstract):

Esta investigación tuvo como objetivo principal identificar por cultivos convencionales, cromogénico y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cepas de *Listeria monocytogenes* en muestras de pepitonas y ostras comercializadas en la ciudad de Cumaná, para ello se analizaron 25 muestras de ostras (*Pinctada imbricata*) y 25 de pepitonas (*Arca zebra*). A ambos productos se les determinó el pH como parámetro de frescura según la Comisión Venezolana de Normas Industriales COVENIN (1315-79), se emplearon dos métodos microbiológicos de detección para *L. monocytogenes*, un método convencional según el Manual Analítico Bacteriológico de la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), en su edición N° 7 (1992) que involucró el uso de medios convencionales y uno alternativo recomendado por la Organización Internacional de Estandarización (ISO 11290-1:1997), para ello se utilizó un medio de cultivo cromogénico. A las cepas aisladas presuntivamente, se les realizaron ensayos de PCR para detectar cepas de *Listeria* sp. y los serotipos principales de *L. monocytogenes*. Los resultados del parámetro pH mostraron valores promedios de 6,45 para las ostras y 6,50 para las pepitonas, valores permitidos por la norma COVENIN. Se reporta que el 12% (6) del total de las muestras evaluadas fueron positivas para *Listeria* sp., de las cuales 10% (5) fueron muestras de pepitonas y 2% (1) de ostras. Ambos métodos microbiológicos aplicados concordaron con la identificación bioquímica de la especie *L. innocua* como único organismo listérico presente en dichas muestras y demostraron la ausencia de *L. monocytogenes*. La identificación por PCR confirmó la presencia de cepas positivas de *Listeria* sp. y demostró que ninguna de las muestras positivas estaban contaminadas por serotipos de la especie patógena *L. monocytogenes*. La presencia de *Listeria* sp., en pepitonas y ostras expandidas en la ciudad indican que el proceso de manipulación de estos alimentos podría propiciar la entrada de cepas patógenas, lo que debe alertar a las autoridades sanitarias a ejercer un mejor control sanitario en cuanto a la manipulación, conservación del producto y de las condiciones higiénicas en los distintos sitios de expendios de los moluscos bivalvos.

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 3/5

Contribuidores:

Apellidos y Nombres	ROL / Código CVLAC / e-mail	
Villalobos Luz Bettina	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> x
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Martínez Rosa Elena	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> x
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Cruz Grau	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> x
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	
Bethsy Cedeño	ROL	CA <input type="checkbox"/> AS <input type="checkbox"/> TU <input type="checkbox"/> JU <input type="checkbox"/> x
	CVLAC	
	e-mail	
	e-mail	

Fecha de discusión y aprobación:

Año	Mes	Día
2011	02	25

Lenguaje: SPA

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 4/5

Archivo(s):

Nombre de archivo	Tipo MIME
TESIS_PM	

Alcance:

Espacial: _____ **(Opcional)**

Temporal: _____ (Opcional)

Título o Grado asociado con el trabajo: Licenciado en Biología

Nivel Asociado con el Trabajo: Licenciatura

Área de Estudio: Biología

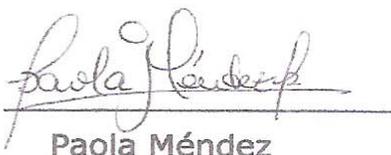
Institución(es) que garantiza(n) el Título o grado:

Universidad de Oriente del Núcleo de Sucre

Hoja de Metadatos para Tesis y Trabajos de Ascenso – 5/5

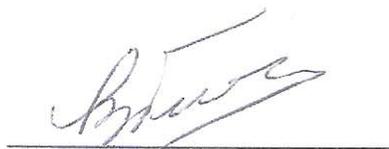
Derechos:

Yo Paola Méndez, titular de la cedula de identidad V- 16 997 420 autorizo a la Universidad de Oriente utilizar este trabajo de grado que lleva por nombre "IDENTIFICACIÓN POR CULTIVOS CONVENCIONALES, CROMOGÉNICO Y PCR DE *Listeria monocytogenes* EN MOLUSCOS BIVALVOS COMERCIALIZADOS EN LA CIUDAD DE CUMANÁ, VENEZUELA" con fines educativo.



Paola Méndez

AUTOR



Luz B. Villalobos

ASESORA



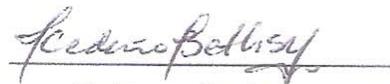
Rosa E. Martínez

COASESORA



Crucita Graü

JURADO 1



Bethsy Cedeño

JURADO 2

POR LA COMISIÓN DE TESIS:

